Leiden, 1954

OVER HET VERBAND TUSSEN TOXICITEIT EN LYSOGENITEIT BIJ CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

R. P. MOUTON

OVER HET VERBAND TUSSEN TOXICITEIT EN LYSOGENITEIT BIJ CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

(WITH A SUMMARY IN ENGLISH)

Uit de afdeling voor Medische Microbiologie van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde en van de Rijksuniversiteit te Leiden.
Hoofd: Prof. Dr. J. D. Verlinde

OVER HET VERBAND TUSSEN TOXICITEIT EN LYSOGENITEIT BIJ CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR H. J. LAM, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DONDERDAG 28 MEI 1959 TE 15 UUR

DOOR

ROBERT PETER MOUTON

geboren te Almelo in 1929

PROMOTOR:

PROF. DR. J. D. VERLINDE

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN VROUW

INHOUD

Inleiding 1

Hoofdstuk I: Historisch overzicht van de onderzoekingen omtrent bacteriophagen. Begripsbepaling 3

Hoofdstuk II: Literatuuroverzicht betreffende C. diphtheriae en de bacteriophaag 12

A. Literatuur betreffende de typen en variaties van C. diphtheriae 12

B. Literatuur betreffende de bacteriophagen van C. diphtheriae 16

Hoofdstuk III: Materiaal en Technieken 24

A. Bacterieculturen 24

B. Phaagisolatie 26

C. Bereiding van phaagsuspensies met hoge titer. Phaagtitratie 31

D. Het bewaren van phaagfiltraten 33

E. Bereiding van phaagresistente, lysogene stammen 33

F. Bereiding en toepassing van antiphaagsera 36

G. Toxiciteitsbepaling van diphtheriestammen 38

H. Bepaling van de invloed van U.V. bestraling op culturen van C. diphtheriae 41

Hoofdstuk IV: Toxiciteit en lysogeniteit bij C. diphtheriae. Experimenten 42

A. Reproductie van de proeven, waarmee conversie werd aangetoond . . 43

B. Onderzoek naar het voorkomen van atoxische diphtheriebacteriën bij lijders aan diphtherie 44

C. Phaagisolatie 46

D. Lysogeniteit en toxiciteit van phaagresistente stammen 48

E. Experimenten ter vaststelling van een eventuele verwantschap tussen geïsoleerde phagen 49

F. Bactericide werking van U.V. bestraling op lysogene en niet-lysogene bacteriën 55

G. Experimenten ten einde niet-lysogene uit lysogene stammen te isoleren 56

Hoofdstuk V: Slotbeschouwing 65

Samenvatting 69

Summary 71

Platen . . . . .

Literatuur 73

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/overhetverbandtu0000rpmo

INLEIDING

Het verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bij Corynebacterium diphtheriae werd voor het eerst beschreven door FREEMAN (1951) bij de stam C4. Verschillende onderzoekers hebben zich sindsdien beziggehouden met dit nieuwe aspect van de lysogene staat van een bacterie. Naast studies omtrent het mechanisme van de conversie van een niet-toxische tot een toxische diphtheriebacterie werden ook de mogelijke consequenties voor de epidemiologie aan een beschouwing onderworpen. Spoedig bleek echter, dat slechts een zeer gering aantal bacteriophagen het vermogen bezit om deze conversie te doen optreden, waardoor vooral het onderzoek naar de epidemiologische facetten van het verschijnsel zeer bemoeilijkt werd. Bovendien kwam uit daartoe gedane experimenten naar voren, enerzijds dat veelvuldig atoxische, lysogene diphtheriebacteriën voorkomen, anderzijds dat de lysogeniteit van vele toxische stammen van C. diphtheriae niet bewezen kon worden. Hierdoor kwam men reeds tot de conclusie dat van een constante relatie tussen toxiciteit en lysogeniteit geen sprake is.

Men moet echter de mogelijkheid voor ogen houden, dat de lysogeniteit van vele toxische stammen van C. diphtheriae niet vastgesteld kon worden wegens het ontbreken van een voor de betreffende phaag gevoelige stam.

Door enige toxische stammen van C. diphtheriae, mede door toepassing van een nieuwe techniek, nader te onderzoeken, hebben wij getracht bewijzen te vinden voor de hypothese dat het vermogen van een diphtheriebacterie om toxine te produceren, afhankelijk is van de lysogene eigenschap.

Tevens hebben wij nagegaan in hoeverre er serologische en immunologische (in de zin van bacteriële immuniteit voor de werkzaamheid van een bacteriophaag) verschillen bestaan tussen bacteriophagen, die conversie kunnen bewerkstelligen en die, welke daar niet toe in staat zijn.

Voorafgaande aan de beschrijving van de door ons verrichte proeven willen wij een hoofdstuk wijden aan de toegepaste technieken en de gebruikte voedingsmedia.

In Hoofdstuk II zal een overzicht worden gegeven van de literatuur betreffende C. diphtheriae en zijn bacteriophagen. Hierbij zullen ook de onderzoekingen, verricht vóór de bevindingen van FREEMAN, ter sprake komen, die licht trachtten te werpen op de betekenis van atoxische diphtheriestammen voor de epidemiologie.

Het nu volgende overzicht van de historische ontwikkeling van de kennis, die omtrent bacteriophagen werd verworven, wil niet op volledigheid bogen. Wij zijn echter van mening dat in een geschrift als dit, waarin veelvuldig zal moeten worden verwezen naar eerder gedane waarnemingen, een dergelijk overzicht niet mag ontbreken.

Hoofdstuk I

HISTORISCH OVERZICHT VAN DE ONDERZOEKINGEN OMTRENT BACTERIOPHAGEN. BEGRIPSBEPALING

Uit d'Hérelle's standaardwerk (1926), dat geheel aan de bacteriophaag is gewijd, blijkt dat deze onderzoeker reeds in 1909 de eerste waarnemingen betreffende de werking van bacteriophagen deed, echter zonder dat de betekenis hiervan direct werd ingezien. Op een voedingsbodem, waarop een cultuur van de coccobacillus acridiorum was uitgestreken, bleken in de cultuur 'plaques' te bestaan, waar geen bacteriegroei zichtbaar was.

Twort (1915) vond tussen confluerende kolonies van micrococcen doorzichtige plekken, die gedurende enige tijd groter werden. Werd materiaal hiervan op een normale micrococcencultuur geënt dan degenereerde ook deze. Het materiaal, dat de degeneratie teweegbracht, bleek filtreerbaar en werkzaam in een 10^{-6} verdunning. Het agens bleek te worden geïnactiveerd bij 60° C. Deze auteur geeft geen definitief antwoord op de vraag of het een virus betreft.

In 1917 gaf d'Hérelle een beschrijving van een 'onzichtbare microbe', die antagonistisch werkzaam was ten opzichte van dysenteriebacteriën. De isolatietechniek (uit faeces) werd beschreven, terwijl ook melding werd gemaakt van de overentbaarheid op en de vermeerdering in dysenteriebacteriën. Interessant was de waarneming dat bij lijders aan dysenterie het verdwijnen van de verwekker uit de faeces samenviel met het verschijnen van genoemde onzichtbare microbe. d'Hérelle stelde voor de naam bacteriophaag te gebruiken voor dit agens dat in staat bleek bacteriën te lyseren. In een volgende publicatie (d'Hérelle, 1918) werd de plaattechniek beschreven, waarmee, afhankelijk van de titer van de phaagsuspensie, losse plaques, confluerende of totale lysis van de bacteriecultuur verkregen kunnen worden. Ook bij lijders aan typhus en paratyphus konden bacteriophagen, specifiek voor de verwekkers van deze ziekten, worden aangetoond.

De betekenis van de bacteriophaag werd in de eerste jaren voornamelijk gezocht in de therapeutische sfeer, getuige de vele publicaties, die meer of minder succes vermeldden van de toepassing van de bacteriophaag bij verschillende ziekten (Kabeshima, 1919; Gratia, 1922; Bordet en Ciuca, 1920, 1920a; d'Hérelle, 1924).

In zijn handboek gaf d'Hérelle (1926) enige ziektegeschiedenissen

van patiënten, die lijdende waren aan dysenterie, typhus, paratyphus, colibacillosen, staphylococcosen, streptococcosen of pest, en die behandeld werden met de bacteriophaag, specifiek werkzaam ten opzichte van de verwekker van de ziekte. In sommige gevallen werd een gunstig resultaat waargenomen.

Bordet en Ciuca (1920) namen waar dat leucocytair exsudaat, verkregen uit de peritoneaalholte van cavia's, die enige dagen tevoren een serie intraperitoneale entingen met E. coli hadden gehad, in staat was een verse colicultuur in vitro te lyseren. Het lysine bleek overentbaar. Het agens was bestand tegen verhitting tot 60°—65° C. Ook konden bacteriën, resistent tegen het lytische agens, gekweekt worden. Deze bacteriën, gevoegd bij een normale colicultuur, bleken het lytische agens te kunnen overbrengen.

In een volgende publicatie verwierpen dezelfde onderzoekers (Bordet en Ciuca, 1920a) de theorie van d'Hérelle, dat de lytische werking veroorzaakt wordt door een ultravirus, en dit op grond van het feit dat het agens temperaturen van 70° C, aceton en aether weerstaat, ofschoon zij ook waarnamen dat het lytische agens overentbaar is. Zij meenden dat de lytische werking veroorzaakt wordt door een leucocytair enzym, dat in staat is bij de bacterie een zodanige genetische verandering teweeg te brengen, dat ook bij overenten het grootste gedeelte van de cultuur gelyseerd word, een vorm van autolyse dus. Bordet en Ciuca wezen op de specificiteit van het lytische agens (andere colistammen werden niet gelyseerd) en op de gevoeligheid er van voor phys. NaCl.

Deze auteurs (1921) konden aantonen dat de bacteriën uit een door het agens gelyseerde cultuur na 150 passages nog het vermogen hadden andere coliculturen te lyseren; deze zogenaamde lysogene eigenschap bleek dus inhaerent aan de bacterie te zijn geworden. Bail (1925) stelde later vast dat phaagdragende bacteriën resistent zijn tegen de betreffende phaag.

Lisbonne en Carrère (1922) slaagden er in overentbare lysis van verschillende bacteriën te verkrijgen door twee verschillende bacterieculturen samen te enten. Zij namen aan dat de lysis van de ene bacterie door een agens van de andere bacterie werd veroorzaakt. Er werd hierbij gesproken over een microbiële interactie. Interessant is de laatste zinsnede uit deze publicatie: 'Une dernière interprétation, il est vrai, restera toujours aux partisans de la théorie du bactériophage: c'est que tous les microbes, issus du contenu intestinal, sont originellement parasités par le bactériophage. Elle est trop en contradiction avec ce que nous savons, actuellement, de la biologie générale des bactéries pour que nous puissions la prendre en considération'.

Uit het een en ander moge blijken dat in de eerste jaren van het onderzoek, de bacteriophaag betreffende, vele tegenstrijdige meningen omtrent de aard van het lytische agens bestonden. Geleidelijk aan, voornamelijk

door het werk van d'Hérelle, won echter de opvatting veld, dat het lytische agens gezien moet worden als een bacterieel virus. Reeds was duidelijk geworden dat de toepassingsmogelijkheden in de therapeutische sfeer niet groot waren. d'Hérelle's handboek (1926) geeft een goede weerspiegeling van de kennis, die in de eerste jaren omtrent de bacteriophaag verworven is. Men ging zich nu steeds meer toeleggen op het onderzoek naar eigenschappen en wijze van werking van de bacteriophaag.

Shwartzman (1928) maakte een studie van de invloed van specifieke bacteriophagen op de antigene eigenschappen van streptococcen. Hij vond, dat streptococcen, die afkomstig waren uit een cultuur, die blootgesteld was geweest aan een voor de betreffende stam specifieke bacteriophaag, en die dus als resistent ten opzichte van deze bacteriophaag beschouwd konden worden, hun specifieke agglutinabiliteit hadden verloren. Partiële of totale antigene modificatie werd waargenomen, terwijl additionele componenten in de antigene structuur verschenen.

Burnet (1929) beschreef een methode (single-step growth proef), waardoor het mogelijk werd de eerste stadia van de vermenigvuldiging van één enkel phaagpartikel in bouillon te volgen. Deze vermenigvuldiging bleek in etappen plaats te vinden, gescheiden door een constante tijdsduur (latente tijd), d.w.z. de tijd, die verloopt tussen het moment van infectie van de bacterie en de lysis.

Burnet en McKie (1929) bestudeerden de typeverschillen bij staphylococcenphagen. Ter differentiëring van 5 geïsoleerde phagen gebruikten zij als criteria de aard en grootte van de plaques, de temperatuurgevoeligheid en de eigenschappen van de ten opzichte van die phaag resistente bacteriën. Ook zij toonden aan dat antigene structuurveranderingen van de bacterie door een phaag veroorzaakt kunnen worden.

De resultaten van onderzoekingen (Den Dooren de Jong, 1931; Cowles, 1931) betreffende phagen bij sporevormende bacteriën, bliezen de strijd over de aard van de bacteriophaag weer nieuw leven in, daar een phaag geïsoleerd bleek te kunnen worden uit een cultuur van B. megatherium, geweekt uit sporen, die gedurende 5 minuten aan een temperatuur van 100° C blootgesteld waren geweest. Den Dooren de Jong meende dat d'Hérelle's theorie over de ultramicrobiële aard van de phaag hiermee onwaarschijnlijk werd. In een andere publicatie (Den Dooren de Jong, 1932) komt deze auteur tot de conclusie dat de bacteriophaag deel moet uitmaken van de celsubstantie, gezien de resistentie tegen hoge temperaturen. Latere onderzoekingen betreffende de aard van deze lysogene eigenschap, die reeds door Bordet en Ciuca (1921) voor colibacteriën werd beschreven, hebben inmiddels de juistheid van deze conclusie bewezen. Voor Den Dooren de Jong's hypothese, dat het vermogen om phagen vrij te maken een bij iedere bacterie aanwezige eigenschap is, die aangetoond kan worden indien een phaaggevoelige stam aanwezig is, konden echter geen bewijzen gevonden worden.

Asheshov en medewerkers (1933), werkend met choleraphagen, beschreven een methode om phagen te typeren, berustend op het principe dat de z.g. secundaire groei van een cultuur, na aan een bepaalde phaag blootgesteld te zijn geweest, resistent is tegen deze phaag. Ook analyseerden zij de kenmerken van door verschillende phagen gevormde plaques. Het begrip lysogenie verwierpen deze onderzoekers; zij namen aan dat er in bepaalde gevallen een soort symbiose bestaat tussen bacterie en phaag, veroorzaakt door een geringe virulentie van de phaag.

Den Dooren de Jong (1931) was de eerste, die de mogelijkheid van het verlies van de lysogene eigenschap van een bacterie aantoonde, zonder dat de bacterie daarbij te gronde gaat: een herhaalde malen overgeënte stam van B. megatherium bleek, met het — onverklaarde — verlies van het vermogen tot sporevorming, ook gevoelig te zijn geworden voor de phaag, die zij oorspronkelijk, in lysogene staat, droeg. Flu (1946) verkreeg in een soortgelijk experiment niet-lysogene, nog wel sporevormende bacteriën uit een lysogene megatheriumstam.

Gratia (1936) slaagde er in een stam van B. megatherium lysogeen te maken door een bepaalde phaag, afkomstig van een andere lysogene stam, daarop te laten inwerken. Burnet en Lush (1936) verkregen lysogene staphylococcen binnen een uur, nadat de cultuur aan een bepaalde phaag (C) was blootgesteld. De hierdoor tegen de betreffende phaag ontstane resistentie schreven zij toe aan een verandering van het bacterieoppervlak. De aard hiervan, genetisch bepaald of direct door de phaag bij iedere generatie teweeggebracht, was de auteurs niet bekend. Volgens Wollman's hypothese (1925) zou het onderscheid tussen deze alternatieven verdwijnen, daar de phaag wordt beschouwd als een gen, dat bij lysogenisatie zijn plaats vindt in het bacteriële organisme.

Onderzoekingen met phagen, werkzaam ten opzichte van Salmonella typhi, lieten zien dat een specifieke Vi-phaag in staat is een cultuur van de Vi-vorm van deze bacterie om te zetten in een cultuur van bacteriën met uitsluitend W (= O)-antigeen (Craigie en Brandon, 1936; 1936a; Craigie en Yen, 1938). Dit resultaat is, behalve door mutatie, ook door selectie te verklaren, hetgeen echter aan de betekenis van deze waarneming niets afdoet.

Een nieuwe toepassingsmogelijkheid van de bacteriophaag werd door Fisk (1942) beschreven. Dit betrof de methode om staphylococcen in groepen in te delen volgens de gevoeligheid voor bepaalde phagen. Deze methode werd later uitgewerkt door Wilson en Atkinson (1945) en Williams en Rippon (1952).

Luria e.a. (1943) maakten electronenmicroscopische studies van vier bacteriophaagstammen, werkzaam ten opzichte van E. coli. De phagen bleken op spermatozoën gelijkende partikels te zijn. Foto's lieten de adsorptie van de phagen aan de gastheercel zien. Na een interval, dat overeenkwam met de latente periode, die berekend was uit de resultaten van

'single-step growth' proeven, was het vrijkomen van virusdeeltjes uit de bacterie waar te nemen.

DELBRÜCK (1940, 1940a) bestudeerde de invloed van de physiologische toestand van de bacterie op de adsorptie van de phaag aan de bacterie. De gevonden adsorptiewaarden bleken een factor 60 te kunnen verschillen. Dezelfde auteur (DELBRÜCK, 1945) vond zeer grote verschillen in 'burst-size' van een coliphaag, d.w.z. in de hoeveelheden phaag, die bij lysis van één bacterie vrijkomen. Antiphaagserum bleek de phaag in de cel niet te beïnvloeden, terwijl de virusadsorptie aan een bacterie, voorbehandeld met antibacterieel serum, sterk geremd werd (DELBRÜCK, 1945a).

DELBRÜCK (1946) gaf in een voortreffelijk overzicht van de stand van zaken in het bacteriophaagonderzoek onder meer een kritische beschouwing van de serologische indeling van phagen, en van de kruisresistentieproeven. De toepassing van antiphaagsera, waarvan HERSHEY, KALMANSON en BRONFENBRENNER (1943) een studie maakten, achtte hij voor het maken van een indeling vrij betrouwbaar, doch aan de resultaten van kruisresistentieproeven (vgl. BURNET en MCKIE, 1929; ASHESHOV, 1933) zou niet veel waarde gehecht kunnen worden wegens het soms (bij gebruik van phaagsuspensies met hoge titer) optreden van serologisch niet te onderscheiden phaagmutanten, die werkzaam zijn ten opzichte van de 'resistente' stam. Toch was het mogelijk met behulp van het kruisresistentiepatroon een indeling te maken van de T-phagen van E. coli, die overeenkomst vertoonde met de serologische.

FLU (1946) gaf een overzicht van de onderzoekingen, die omtrent bacteriophagen verricht waren sinds de waarnemingen van d'HÉRELLE.

In de jaren na 1945 heeft de kennis omtrent de bacteriophaag zich zeer snel uitgebreid, zowel door studies van factoren, die de genetisch vastgelegde eigenschappen van bacterie en phaag bleken te kunnen beïnvloeden, als van de chemisch en physisch werkzame agentia op een bacteriophaag en op de binding phaag-bacterie.

LURIA en DULBECCO (1949) deden de belangrijke waarneming dat een genetische recombinatie van twee phaagdeeltjes, afkomstig van verschillende, geïnactiveerde bacteriophagen, mogelijk is. Transductie, d.w.z. het overbrengen van genetisch vastgelegde eigenschappen van de ene bacterie op de andere, door een phaag, werd voor het eerst beschreven door ZINDER en LEDERBERG (1952) voor Salmonella typhimurium. IONESCO (1953) nam veranderingen waar in de morphologie van kolonies van een stam van B. megatherium wanneer deze lysogeen gemaakt werd.

FREEMAN (1951) vond een correlatie tussen de lysogene eigenschap en de toxiciteit bij een stam van C. diphtheriae. Aan dit verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bij diphtheriestammen, waarvan ook verscheidene andere onderzoekers (o.a. GROMAN, 1953; PARSONS en FROBISHER, 1951; HEWITT, 1952) reeds een studie maakten, zullen wij de volgende hoofdstukken wijden.

COHEN c.s. verschafte gegevens omtrent de samenstelling van media, die optimaal zijn voor de vermeerdering van bacteriophagen (FOWLER en COHEN, 1948; COHEN, 1949). Zo bleek onder meer dat tryptophaan noodzakelijk is voor de vermeerdering van coliphagen. Kationen bleken een stabiliserende invloed te hebben op phaagsuspensies (LARK en ADAMS, 1953).

Nadere gegevens omtrent de factoren, die het vrijkomen van bacteriophagen uit lysogene bacteriën bevorderen, werden verschaft door LWOFF en zijn school. Tot deze groep van 'inductoren' bleken o.a. te behoren U.V.- en X-stralen (LWOFF, SIMINOVITCH en KJELDGAARD, 1950; LWOFF, 1951), tevens verschillende reducerende stoffen (LWOFF en SIMINOVITCH, 1952) en ook cancerogene stoffen (LWOFF en JACOB, 1952; JACOB en WOLLMAN, 1953). In een latere publicatie vatte LWOFF (1953a) de problemen van de inductie samen.

In dit verband willen wij ook noemen de waarneming van ROMANZI e.a. (1957), aan wie het gelukte om, door afkoeling van een cultuur, een phaag te isoleren uit een bacterie, die als niet-lysogeen werd beschouwd en gevoelig was gebleken voor deze zelfde phaag. De juistheid van deze waarneming zal o.i. echter nog moeten blijken.

De invloed van zichtbaar licht op bacteriën — al dan niet lysogeen — die blootgesteld zijn geweest aan U.V. bestraling, werd onder meer bestudeerd door LATARJET en MILETIC (1953). Lichtstralen van een golflengte van 3400—5500 Å bleken de inducerende c.q. letale werking van U.V. stralen binnen bepaalde grenzen ongedaan te kunnen maken. WEIGLE (1953) toonde aan dat ook U.V. bestraling in bepaalde omstandigheden hiertoe in staat is, nl. indien de met U.V. bestraalde phaag geadsorbeerd is aan een eveneens met U.V. bestraalde bacterie. Dit op deze wijze verkregen herstel van de phaag bleek gepaard te gaan met het frequent optreden van phaagmutanten.

Bevriezen van phaagsuspensies leidt tot inactivering, waarvan de mate o.a. afhankelijk is van de temperatuur, waarbij ontdooid wordt, en van temperatuurwisselingen in de bevroren staat (PANYEL, HUPPERT en BARBU, 1957).

De latente periode en de 'burstsize' bleken ook sterk afhankelijk van de temperatuur, waarbij het phaagbacteriemengsel geïncubeerd wordt. Uit proeven met de phaag P_1 en Sh. dysenteriae kwam naar voren dat lage temperaturen de lytische werking van deze phaag verminderen, terwijl het percentage bacteriën, die lysogeen worden, stijgt (BERTANI en NICE, 1954). CHRISTENSEN (1957) vond dat chloramphenicol in staat is om, na blootstellen van Sh. dysenteriae aan phaag P_1, het percentage bacteriën, die lysogeen worden, aanzienlijk op te voeren.

Anaerobe omstandigheden bevorderen de lysis van een cultuur van een lysogene B. megatherium (WELSHIMER, 1951).

Een recente studie van de factoren, die een rol spelen bij de adsorptie

van phaag aan bacterie, werd gemaakt door GUELIN en LÉPINE (1957), die de invloed nagingen van de afmetingen van verschillende phagen, van het aantal bacteriën, van de ionenverhoudingen in het medium, van de adsorptietijd en van de temperatuur.

De verschillende aspecten van de lysogenie werden in de laatste jaren belicht door LWOFF (1953, 1957), BERTANI (1953, 1953a, 1954, 1958) en BOYD (1956). LWOFF en GUTMANN (1950) introduceerden het begrip prophaag, waarmee bedoeld wordt de vorm, waarin de phaag zich in de lysogene bacterie bevindt. In deze vorm is de phaag niet infectieus. Tegenwoordig neemt men aan dat de prophaag identiek is met het genetische materiaal van de phaag, gemodificeerd door aanhechting aan een chromosoom van de bacterie. De specifieke 'locus' van het bacteriële chromosoom, waar het genetische materiaal van de phaag zich aan hecht, noemde LWOFF (1957) 'phoron'. Enige definities van termen, die betrekking hebben op de lysogenie, kan men vinden in een publicatie van JACOB, LWOFF, SIMINOVITCH en WOLLMAN (1953).

In zijn verhandeling over lysogenie bespreekt LWOFF (1953) ook de mogelijkheden om een niet-lysogene uit een lysogene bacterie te verkrijgen. In Hoofdstuk IV zullen wij hier dieper op ingaan.

De begrippen virulent en gematigd (temperate) werden door LWOFF (1953) en BERTANI (1953a) behandeld. Gematigde phagen kunnen de gastheercellen lysogeen maken, terwijl virulente phagen altijd lysis van een voor die phaag gevoelige bacterie veroorzaken. Mutaties van gematigd naar virulent komen geregeld voor. De lysogene staat van een bacterie wordt gekenmerkt door twee eigenschappen:

a. er bestaat een, meetbare, kans op (spontane) lysis, waarbij phagen vrijkomen. Uit de verschillen in latente tijd is gebleken, dat het mechanisme van de stap: lysogene bacterie $\xrightarrow{\text{inductie}}$ lysis, een ander moet zijn dan dat van de lysis van een bacterie, die optreedt direct na infectie met een phaag (BERTANI, 1958);
b. er bestaat immuniteit voor de lytische werking van een phaag van het type, dat de lysogene bacterie vrij kan maken. Toch strekt deze immuniteit zich niet altijd uit tot alle phagen, die serologisch verwant zijn met de homologe phaag (BERTANI, 1958; BOYD, 1956a). Als regel beinvloedt de lysogene staat niet het vermogen tot phaagadsorptie; de immuniteitsreactie vindt dus later plaats (BERTANI, 1953a).

Er bestaan ook z.g. defectief lysogene stammen. Deze zijn wel immuun voor de lytische werking van de homologe of daaraan verwante phagen, maar maken weinig of geen phagen vrij bij lysis door inductie (BERTANI, 1953a; JACOB, FUERST en WOLLMAN, 1957; ARBER en KELLENBERGER, 1958).

Men neemt aan dat een gematigde phaag, bij superinfectie van een bacterie, lysogeen door infectie met een verwante phaag, optreedt in de

vorm van pre-prophaag (BERTANI, 1954). Deze kan zich niet als zodanig vermeerderen, terwijl bij deling van de bacterie de pre-prophagen willekeurig over de dochtercellen verdeeld worden. Bij spontane lysis, die echter zelden voorkomt, kunnen ook de pre-prophagen phagen produceren. Iedere pre-prophaag heeft een kleine kans een prophaag te worden, òf door de prophaag te vervangen (prophaagsubstitutie), òf door de bestaande prophaag te 'vergezellen', waardoor een dubbel lysogene bacterie ontstaat.

Door gebruik te maken van stofwisselingsgiffen en ultrasonische trillingen wist DOERMANN (1948) voortijdige lysis van een met phaag geïnfecteerde bacterie te verkrijgen. Zo kon de eerste vrije phaag 8 minuten na adsorptie worden aangetoond, terwijl de normale latente tijd van dit bacterie-phaagsysteem 23 minuten bedroeg. WEIGLE en DELBRÜCK (1951) infecteerden een geïnduceerde lysogene colistam (K 12 λ) met de phaag T 5, met kortere latente tijd dan de phaag λ. Daar na lysis van de bacteriën bleek, dat er ook vermeerdering van de phaag T 5 had plaatsgevonden, werd er geconcludeerd, dat de penetratiehypothese, volgens welke een in een bacterie aanwezige phaag het binnendringen van een andere phaag kan beletten, zeker niet in alle gevallen juist is.

Met behulp van radioactieve isotopen toonden HERSHEY en CHASE (1952) aan, dat als een phaag (coliphaag T 2) zich hecht aan een bacterie, het grootste deel van het phosphorhoudende phaag D.N.A. de cel binnengaat, en dat een residu, dat tenminste 80% van het zwavelhoudende phaageiwit bevat, aan het celoppervlak gehecht blijft. Phosphor en adenine, afkomstig uit het phaag D.N.A., worden in aanzienlijke en gelijke mate overgebracht op de phaagprogenituur. Het zwavelhoudende eiwit bleek het enige of voornaamste antigene materiaal van de phaag te vormen, het is tevens verantwoordelijk voor de hechting van virus aan bacterie. Adsorptie van de phaag aan bacterieel débris leidde tot inactivering van de phaag. Daar een deel van het phaag D.N.A. hierbij in oplossing ging werd een scheuren van de phaagmembraan aangenomen. Het phaageiwit bleef aan het débris gehecht.

HERRIOT (1951) stelde vast dat door osmotische shock van T 2-phagen verkregen phaag-'ghosts', die geen phosphor (dus geen D.N.A.) meer bevatten, nog wel in staat waren bacteriën te lyseren. Dit zou er op wijzen dat de phosphorhoudende structuren van de phaag niet alleen niet essentieel zijn voor de specifieke adsorptie, doch ook niet voor het vermogen om de bacterie te lyseren. In hoeverre de waarnemingen van HERSHEY en CHASE en die van HERRIOT met elkaar in overeenstemming te brengen zijn, zal nader onderzoek moeten uitwijzen.

WATSON en CRICK (1953, 1953a) stelden een aannemelijke structuur voor van het D.N.A., welke te meer aanvaardbaar lijkt wegens de mogelijke verklaring, die hiermee gegeven kan worden voor de vermeerdering van het D.N.A.

Tenslotte willen wij nog de publicatie vermelden van ECKART (1956), die in een overzicht van de literatuur van de phaagonderzoekingen van de laatste jaren vooral de gegevens, die zijn verkregen uit de biochemische studies van de phaag met betrekking tot de gastheer, aan een kritische beschouwing onderwerpt.

In het bovenstaande hebben wij getracht een indruk te geven van de kennis omtrent bacteriophagen, die gedurende de laatste decennia is vergaard. In het algemeen zijn wij alleen daar in details getreden, waar het gegevens en begrippen betrof, die bij de bespreking van onze eigen proefnemingen ter sprake zullen komen. Voor een meer volledig literatuuroverzicht mogen wij verwijzen naar de publicaties van ADAMS (1950), ECKART (1956), LWOFF (1957) en BERTANI (1958).

Hoofdstuk II

LITERATUUROVERZICHT BETREFFENDE C. DIPHTHERIAE EN BACTERIOPHAAG

Het zou buiten het bestek van dit werk vallen om hier een min of meer volledig overzicht te geven van de literatuur, die in de laatste halve eeuw aan de verscheidenheid van onderzoekingen over C. diphtheriae is gewijd. Wij willen ons beperken tot een bespreking van de studies betreffende de bacteriophagen van C. diphtheriae, en van die, welke gemaakt zijn van de typen en variaties van C. diphtheriae en hun mogelijk onderling verband.

De publicaties, die betrekking hebben op de bepaling van de toxiciteit van een diphtheriecultuur, zullen worden behandeld bij de beschrijving van de door ons gebezigde techniek.

De betekenis van het vóórkomen van atoxische diphtheriebacteriën, zowel als van meer typen die wel toxine vormen, werd al vroeg ingezien. De bevindingen van Freeman vormen echter zeker nog geen volkomen bewijs voor het klinische en epidemiologische belang van de atoxische soort en de bacteriophaag. Het is interessant om vast te stellen, dat juist in het decennium voorafgaand aan de ontdekking van Freeman, de resultaten van de vele onderzoekingen, die omtrent de mogelijke pathogeniteit van atoxische diphtheriebacteriën werden gedaan, een geheel ander facet van de atoxische vorm lieten zien.

Ter wille van de overzichtelijkheid zullen eerst die literatuurgegevens aangehaald worden, welke betrekking hebben op de typen en variaties van de diphtheriebacterie. Daarna zullen de onderzoekingen omtrent de bacteriophagen van C. diphtheriae en de daarmee verband houdende conversie van atoxiciteit naar toxiciteit worden besproken.

A. *Literatuur betreffende de typen en variaties van C. diphtheriae*

De pathogeniteit van een diphtheriebacterie kan alleen vastgesteld worden door middel van een caviaproef; culturele, morphologische en biochemische eigenschappen kunnen geen aanwijzingen geven in deze. Dit was de conclusie van Jordan en Kingsbury (1922), die 74 virulente en 32 avirulente stammen onderzochten. In zijn algemeenheid geldt dit nog steeds. Alleen de toxiciteitsbepaling in vitro, volgens Elek (1948), heeft het vaststellen van het vermogen tot toxineproductie eenvoudiger gemaakt.

Sinds het werk van Jordan en Kingsbury hebben verscheidene onder-

zoekers een studie gemaakt van de atoxische stammen van C. diphtheriae. DUDLEY (1925) spoot grote doses atoxische diphtheriebacteriën intraperitoneaal in bij cavia's, met in vele gevallen de dood als gevolg. Deze letale werking bleek vaak door antitoxine te kunnen worden verhinderd, terwijl injectie van toxische stammen blijkens sectie dezelfde laesies gaf. DUDLEY zocht de oorzaak van de pathogeniteit van de atoxische stammen in een endotoxine. CROWELL (1926) slaagde er in om, uitgaande van een 'één-cel' cultuur, een atoxische variant uit een oorspronkelijk geheel toxische cultuur te isoleren. Ook COWAN (1927) verkreeg, door herhaalde passage en selectie van korrelige kolonies, een atoxische variant uit een toxische stam. OKELL (1929), die de resultaten van COWAN niet kon bevestigen, onderzocht een groot aantal toxische en atoxische stammen met behulp van de agglutinatiereactie. Serologische identiteit van toxische en atoxische stammen bleek zeldzaam, echter juist in gevallen, waarin een gemeenschappelijke bron aannemelijk was te maken, kwam deze meer voor dan verwacht mocht worden. De schrijver verbond overigens geen duidelijke conclusie aan deze bevinding.

FROBISHER en PARSONS (1940) vergeleken de afwijkingen, veroorzaakt door intracerebrale enting van atoxische en toxische diphtherieculturen bij muizen. De neurologische verschijnselen, door deze stammen teweeggebracht, waren niet van elkaar te onderscheiden, al was het percentage muizen, die kenmerkende reacties lieten zien, hoger bij de groep, die ingespoten was met de toxische stam. Gelijktijdige toediening van antitoxine kon ook in de groep van met atoxische bacteriën ingespoten muizen de reactie soms verhinderen. Geen enkel ander micro-organisme was in staat dezelfde symptomen op te wekken. De oorzaak werd ook nu gezocht in een specifiek endotoxine. Subcutane injectie van atoxische stammen bij 7—20 dagen oude kuikens had geen effect, in tegenstelling tot de toediening van toxische stammen, welke snel tot de dood leidde. Kuikens bleken dus ook bruikbaar te zijn voor een toxiciteitsbepaling (FROBISHER, PARSONS en T'UNG, 1942).

Konijnen, die herhaalde injecties kregen met bouillonculturen van atoxische diphtheriebacteriën, werden in zekere mate resistent tegen de toxische soort, hoewel antitoxine niet in het bloed aantoonbaar was. Herhaling van deze proeven met gebruikmaking van atoxische stammen, gekweekt in een medium, bereid met kalfsvlees in plaats van het eerder gebruikte varkensvlees, liet geen beschermende werking zien van injecties met atoxische bacteriën (FROBISHER en PARSONS, 1943; FROBISHER en UPDYKE, 1947). Men slaagde er niet in uit varkensvlees een stof te isoleren, die de antigene werking bevordert. Het mechanisme van de resistentie zou berusten op een binding van het toxine in de subcutane weefsels. In een samenvatting (FROBISHER, PARSONS en UPDYKE, 1947) werd ook gewezen op de waarnemingen van CHASON (1936) en STEBBINS (1940), die een, in vergelijking met het aantal dragers van virulente diphtherie-

bacteriën, onverklaarbaar hoog aantal Schick-negatieve kinderen vonden. Dit aantal was echter beter in overeenstemming te brengen met het percentage dragers van atoxische diphtheriebacteriën. Bij de getallen, die GILL (1940) vond, was dit ook het geval. De weerstand van deze kinderen tegen diphtherie zou verhoogd worden door een immuniserende werking van de atoxische bacteriën. De hypothese werd opgesteld, dat een endoxine van de atoxische bacteriën immunologisch verwant is met het exotoxine van de toxische soort, of misschien een stof is, waaruit het exotoxine in bepaalde omstandigheden wordt gevormd. Het feit dat atoxische stammen worden gekweekt bij gevallen van klinische diphtherie, wijst er ook op dat atoxische diphtheriebacteriën op de een of andere manier betrokken kunnen zijn bij deze ziekte.

Ongetwijfeld zijn de proeven van FROBISHER mede aanleiding geweest tot de verschillende experimenten, die de laatste jaren zijn gedaan ter vaststelling van de waarde van bacteriële vaccins voor de diphtherieprophylaxe. BOWEN, WYMAN en MCCOMB (1954) vonden dat immunisatie van cavia's met gewassen cellulaire antigenen gedeeltelijke bescherming geeft tegen infectie met toxische diphtheriebacteriën, echter niet tegen de werking van toxine. De beschermende werking was bovendien alleen duidelijk, indien gevaccineerd werd met homologe stammen. De schrijvers kwamen dan ook tot de slotsom, dat het toevoegen van cellulaire antigenen aan een diphtherievaccin de immuniserende waarde niet merkbaar verhoogt, daarentegen wel, gezien de vaak ernstige locale reacties, het vaccin toxisch of allergeen kan maken.

Naar aanleiding van het feit, dat immunisatie van cavia's met een levende cultuur van een atoxische stam van C. diphtheriae ± 50% van de dieren beschermde tegen infectie met een toxische stam van hetzelfde serotype, meende LAUTROP (1955), dat bij diphtherie, naast de immuniteit door antitoxine, tevens een antibacteriële immuniteit ontstaat. Ook FLECK en KUNICKA (1957), die gecombineerde immunisatie met bacteriële antigenen en toxoid toepasten, hechtten waarde aan de beschermende werking van een vaccin, waarin deze antigenen zijn opgenomen, daar het gecombineerde vaccin in een hoger percentage van de behandelde dieren bescherming gaf dan het toxoid alleen. Het bacteriële antigeen werd bereid uit het, meest voorkomende, serotype 24. Toepassing bij 2 volwassenen en 39 kinderen bewees de onschadelijkheid en werkzaamheid van dit vaccin.

ANDERSON en medewerkers (1931) waren de eersten, die de diphtheriebacteriën onderverdeelden in typen: gravis en mitis. Deze indeling is, behalve op morphologische, biochemische en culturele eigenschappen, ook gebaseerd op klinische verschillen. Er zouden 5—10% intermediaire vormen zijn. De auteurs waren van mening dat de eigenschappen van de twee typen gefixeerd zijn.

Mair (1936), die ook een studie maakte van de typen van C. diphtheriae, stelde vast dat een groot percentage van de stammen, die bij dragers en reconvalescenten gevonden werden, tot het mitistype behoorde, evenals alle niet-toxische stammen. Parsons en Frobisher (1940) vonden echter ook atoxische gravisstammen. De verschillende typen kunnen volgens Mair in synthetische media in elkaar over gaan.

Siemens (1938) zocht de oorzaak van de typeverschillen in adaptatietoestanden van één genotype. Morton (1940) beschouwde de typen als smooth, intermediate en rough vormen. Volgens hem pleiten zowel de frequent voorkomende overgangsvormen als enige publicaties (o.a. Christison, 1933; Menton e.a., 1933; Robinson, 1934) omtrent typewijziging voor een dergelijke indeling.

Op grond van mislukte pogingen om in vitro tot typeverandering te komen, besloot Von Prittwitz (1943) dat men niet van een neiging tot variabiliteit van C. diphtheriae in vitro mag spreken. Later wist echter Oeding (1950), door onder meer gebruik te maken van media, die arm waren aan voedingsstoffen, volledige transformatie te verkrijgen van gravis in mitis en omgekeerd, tevens van intermedius in gravis. Oeding zag de gravis-, intermedius- en mitisvormen als dissociatieve phasen en niet als subtypen. Behandeling met antibiotica bleek ook een —weliswaar reversibele — verandering van type te kunnen veroorzaken (Garbin, 1956).

Stoppelman (1948) was van mening dat alleen typeverandering mag worden aangenomen, indien ook veranderingen in antigene structuur kunnen worden aangetoond. Al werd in vitro een enkele maal typewijziging waargenomen, voor epidemiologisch onderzoek leken haar de typen voldoende constant, hoewel tegen het einde van een epidemie het aantal atypische stammen bleek toe te nemen. Juist op epidemiologische gronden suggereerde McLeod (1950) de mogelijkheid van het bestaan van een evolutiecyclus van de typen in een populatie: mitis → intermedius → gravis → gravisachtig → mitis.

Een aanvaardbare verklaring voor de klinische verschillen tussen de gravis- en mitistypen gaf Amies (1954). Het gravistype zou ernstiger ziektevormen geven door een snellere toxinevorming met als gevolg dat de plaatselijke ontstekingsreactie in een vroeg stadium geremd wordt en niet zijn functie als afweermechanisme kan ontplooien. De betrekkelijk geringe plaatselijke reactie bij ernstige gevallen van diphtherie zou hier ook voor pleiten.

Serologische typering van C. diphtheriae, door middel van een agglutinatiereactie, werd in de laatste jaren onder meer verricht door Hewitt (1947) en Ferris (1950). Hewitt verdeelde enige honderden stammen onder in 57 serologische typen. Bepaalde gravis- en mitisstammen bleken serologisch identiek. Met deze techniek waren geen duidelijke verschillen aan te tonen tussen toxische en atoxische stammen (Hewitt, 1947, 1948).

Ferris vond een goede, zij het niet absolute correlatie tussen virulentie en serologisch type.

Fleck, Duros-Kawecka en Stankiewicz (1957) namen verschillende serologische typen waar tijdens een epidemie, waarin echter één type (24) domineerde. Ook zij hadden te kampen met het feit, dat het 0-(groeps) antigeen een verwarrend element bij de agglutinatiereactie kan zijn, zoals Lautrop (1950) reeds vaststelde. Waarschijnlijk is dit de reden geweest dat Freeman en Minzel (1950), die de agglutinatietechniek betrouwbaarder wisten te maken door gebruik te maken van homogene bacteriesuspensies, verkregen door Tween 80 toe te voegen aan het medium (Minzel en Freeman, 1950), geen serologische verschillen konden aantonen tussen verscheidene toxische stammen.

Voorlopig lijkt de serologische typering alleen van waarde voor epidemiologisch onderzoek, echter niet ter vaststelling van het type (gravis of mitis) en de toxiciteit.

B. *Literatuur betreffende de bacteriophagen van C. diphtheriae*

In 1922 beschreef d'Hérelle twee bacteriophaagstammen met een lytische werkzaamheid ten opzichte van C. diphtheriae, en geïsoleerd uit faeces van paarden, geïmmuniseerd met diphtheriecultuuren. De lysis van een cultuur van C. diphtheriae, veroorzaakt door methylviolet, medegedeeld door Botez (1921), is ook terug te brengen tot de werking van een phaag, gezien de overentbaarheid van het 'lysine'. Het methylviolet was hierbij mogelijk als inductor werkzaam. Blair (1924) wist langs verschillende wegen een lytisch agens voor diphtheriebacteriën te verkrijgen, dat volgens hem ook lytisch werkte ten opzichte van enige enterobacteriën. De overentbaarheid van het agens werd niet nagegaan. Fejgin (1925) toonde aan, dat een door haar uit een oude diphtheriecultuur verkregen lytisch agens een plaque kon vormen in een verse diphtheriecultuur, geënt op agar.

Klosterman en Small (1928) uitten kritiek op de voorgaande onderzoekers wegens de geringe bewijskracht van de verkregen resultaten. Na vele mislukte pogingen isoleerden zij een phaag uit de faeces van een paard, gebruikt voor de antitoxinebereiding. Na enige passages op een voor deze phaag gevoelige stam werden confluerende plaques op agar gezien, echter ook na 22 passages volgde geen volledige lysis. De phaag bleek geïnactiveerd te worden bij temperaturen van 50—55° C.

Smith en Jordan (1931) bestudeerden vooral de eigenschappen van de voor een phaag gevoelige en resistente bacteriën in een cultuur van een stam van C. diphtheriae. De kolonies van de resistente stam bleken tot het roughtype te behoren, terwijl na enige passages van de gevoelige bacteriën de periode, voordat een secundaire cultuur van resistente vormen ontstond na lysis, korter werd. Uit het optreden van de resistente kolonie-

vormen en de soms bestaande neiging tot suicide, leidden de schrijvers af dat de stam zelf lysogeen was.

STONE en HOBBY (1934) isoleerden 18 phaagstammen, waarvoor 4 stammen van C. diphtheriae gevoelig waren. Deze laatste lieten na enige bouillonpassages reinculturen van coccoide vormen zien, die bij enting op Loefflerserum weer overgingen in staafvormen. Uit het feit dat juist in een cultuur van coccoide vormen na enige overentingen hoge phaagtiters bereikt konden worden, concludeerden deze auteurs dat de coccoide vorm van C. diphtheriae dat stadium in diens ontwikkeling is, dat specifiek gevoelig is voor bacteriophaag.

Een begin van phaagtypering van C. diphtheriae werd gemaakt door KEOGH, SIMMONS en ANDERSON (1938); 480 Australische stammen werden onderzocht op gevoeligheid voor twee phagen, S en L. Het serologische type gravis I bleek gevoelig voor de S-phaag en lysogeen wat betreft de L-phaag, gravis II was gevoelig voor beide phagen, intermedius alleen voor L en mitis voor geen van beide. De volgende, die getracht heeft phaagtypering bij diphtheriebacteriën toe te passen was TOSHACH (1950). Van 137 stammen waren er 29 gevoelig voor een of meer van 8 geïsoleerde phagen, waarvan er 6 identiek waren. Het gevoeligheidspatroon gaf echter geen hechte basis voor classificatie. Twee phagen konden aan andere stammen geadapteerd worden. Electronenmicroscopisch werden bovendien de afmetingen van de diphtheriephaag bepaald: 'kop'-diameter 60 mμ, 'staart'lengte 300 mμ en 'staart'breedte 10 mμ.

Door een viertal phagen aan verscheidene diphtheriestammen te adapteren wist FAHEY (1952) een aantal mutanten te verkrijgen met een sterk uitgebreid infectiespectrum. Met 30 phagen, waaronder vele van deze mutanten, konden 122 van de 125 onderzochte stammen worden ingedeeld volgens phaaggevoeligheidspatronen. Daar de laatste een grote mate van 'overlapping' vertoonden werden 136, merendeels andere, stammen getest op gevoeligheid voor 5 phagen, die een grote activiteit hadden laten zien. Hiervan konden er 68 ingedeeld worden in 9 phaagtypen. Er bestond geen correlatie tussen phaagtype en type van C. diphtheriae. THIBAUT en FRÉDERICQ (1956) deelden 397 van 450 onderzochte gravisstammen in in 9 phaagtypen, waarvoor 8 phagen gebruikt werden.

Eerder hadden dezelfde auteurs (THIBAUT en FRÉDERICQ, 1952) nagegaan in hoeverre U.V. bestraling een inducerende werking heeft op lysogene diphtheriestammen. Er werd vastgesteld dat inductie mogelijk is, doch dat de door de bestraling veroorzaakte vermindering van bacteriën, in staat om een kolonie te vormen, niet in verhouding was met het aantal vrijgekomen phagen. Dit kon verklaard worden door het feit, dat minstens 50% van de vrije phaagdeeltjes geïnactiveerd werd door de dosis U.V., nodig voor inductie.

De eerste publicatie, waarin melding gemaakt wordt van het vermogen

van een bacteriophaag om een bepaalde atoxische stam van C. diphtheriae om te zetten in een toxische, is afkomstig van FREEMAN (1951). Toxiciteitsproeven in vivo zowel als in vitro lieten zien, dat de resistente groei van een samen met bacteriophaag B gedurende 18 uur geincubeerde cultuur van een atoxische stam (444A) toxine produceerde. De toxische en tegen phaag B resistente stam (444V) bleek een phaag te dragen, die niet te onderscheiden was van phaag B. Een andere phaag, A, was niet in staat deze conversie te bewerkstelligen. De resultaten van de proeven met phaag B werden door PARSONS en FROBISHER (1951) bevestigd, terwijl een andere phaag, A6 (identiek met de A-phaag van FREEMAN), nu ook tot conversie in staat bleek. Opmerkelijk is de waarneming, dat twee atoxische stammen, geïsoleerd bij reconvalescenten, wel in toxische konden worden omgezet, terwijl dit niet het geval was bij enige stammen, geïsoleerd bij gezonde dragers. Dezelfde schrijvers (PARSONS en FROBISHER, 1953) stelden, na een onderzoek van 44 stammen en 6 phagen, vast dat deze virulentieverandering alleen bij mitisachtige stammen opgewekt kan worden.

Cultuurfiltraten van willekeurige toxische stammen hadden geen invloed op atoxische stammen (FREEMAN, 1951). Dit zou er op wijzen dat een extra-cellulair product niet het voor de conversie verantwoordelijke agens is, doch dat de phaag daarbij een rol speelt. Een phaagvrij filtraat van de toxische stam heeft FREEMAN echter niet kunnen bereiden. Na 4 opeenvolgende één kolonie-isolaties van de atoxische stam was phaag B nog in staat deze stam om te zetten in een toxische. Ofschoon het verkrijgen van de toxische stam door selectie hiermee niet geheel uitgesloten is, is dit hiermee wel onwaarschijnlijk gemaakt.

Proeven met 'één-cel'-culturen gaven dezelfde resultaten (FREEMAN en MORSE, 1952). Door middel van celdesintegratie toonden deze auteurs tevens aan, dat geen gepreformeerd toxine in de atoxische bacteriën aanwezig was.

Serologisch bleken de atoxische en de hieruit verkregen toxische stam identiek. FREEMAN en MORSE hebben nog getracht om de toxische subculturen phaagvrij te krijgen met het doel om vervolgens na te gaan of de toxiciteit nog volledig aanwezig was. Dit is echter niet gelukt.

PARSONS en FROBISHER (1953) gaven nog andere argumenten voor de theorie van een direct door de phaag veroorzaakte mutatie, n.l. dat de toxische klonen in een veel groter aantal gevonden worden in de resistente cultuur dan volgens een normale mutatieratio verwacht zou mogen worden, en dat in de atoxische culturen zonder phaag nooit toxische kolonies gevonden zijn, terwijl in de resistente cultuur alleen kolonies met een duidelijke lysis toxisch bleken te zijn.

GROMAN (1953, 1953a, 1955), BARKSDALE en PAPPENHEIMER (1954) en HEWITT (1954a) wisten door een serie onderzoekingen het directe verband tussen lysogeniteit en toxiciteit bij de stam 444V waarschijnlijk te maken. Een sterk argument tegen de selectiehypothese werd verkregen

door van een mengsel van stam 444A en phaag 444V/A op geregelde tijden een monster af te nemen en dit, na enting op platen, na te zien op toxische en atoxische bacteriën (GROMAN, 1953). De toename van het aantal toxische bacteriën bleek veel groter dan bij optimale vermenigvuldiging zou optreden. (De phaag 444V/A is identiek met de eerder genoemde B-phaag; later werd door BARKSDALE en PAPPENHEIMER (1954) een nieuwe nomenclatuur voorgesteld, die nu algemeen wordt gebruikt: β = gematigde phaag, die lysogeen en toxisch maakt (= 444V/A); B = virulente mutant van β).

Ook de volgende proef pleit tegen selectie van een mutant: De atoxische stam 444A werd gemengd met phaag 444V/A in bouillon en gedurende een half uur geïncubeerd bij 37° C. Het mengsel werd dan verdund en over platen uitgestreken, waarbij de verdunning van de phaag zodanig was dat geen contact kon bestaan tussen phaagdeeltjes en de zich ontwikkelende kolonies; het percentage der met phaag besmette cellen, die zich ontwikkelden tot toxische kolonies, was veel groter dan volgens een normale mutatiekans te verwachten was (GROMAN, 1953). Later wijzigde GROMAN (1953a) deze proefopstelling door gebruik te maken van antiphaagserum ten einde inwerking van phaag op de reeds op een plaat geënte bacteriën te voorkomen. Het percentage toxische kolonies bleek nu nog groter. De mogelijkheid, dat een ander agens de conversie bewerkstelligt, meende GROMAN te kunnen uitsluiten op grond van de overweging dat men in dat geval ook niet-lysogene toxische en lysogene atoxische klonen zou moeten vinden. Een volledige correlatie tussen de werkzaamheid van de phaag en die van een ander agens achtte hij onwaarschijnlijk. Bovendien is het feit dat binnen 20 minuten na het toevoegen van phaagfiltraat aan de bacteriecultuur soms tot 7% van de bacteriën geconverteerd zijn, niet door selectie te verklaren.

HEWITT (1954a) filtreerde een suspensie van een phaag met converterend vermogen door een filter met een gemiddelde poriediameter van 0.07 μ, waardoor eventuele bacteriële metabolieten uitgefiltreerd werden. De membranen, waarop het virus was achtergebleven, werden uitgewassen. Met dit materiaal werden dezelfde resultaten verkregen.

Om vast te stellen of bij de omzetting van atoxische in toxische bacteriën geen sprake is van transductie (zie blz. 7), zoals beschreven door ZINDER en LEDERBERG (1952) bij Salmonella, heeft GROMAN (1955) 5 opeenvolgende isolaties verricht van één plaque op de stam C4 (= 444A). Van elk van 5 geënte platen werden 10 plaques uitgezocht en geënt in bouillon met als contrôles 10 plekken, vrij van plaques. Alle 50 culturen van plaquemateriaal bleken toxisch en lysogeen, terwijl de 10 contrôleculturen atoxisch en vrij van phaag waren. In dit systeem heeft dus ieder plaquevormend deeltje het vermogen C4 toxisch te maken; ofschoon de verdunning in de beschreven proef voldoende gelegenheid bood tot scheiding van het infecterend en het converterend vermogen van de phaag, ge-

schiedde dit niet. Het converterend vermogen van de β-phaag is dus niet afhankelijk van phaagvermeerdering in de gastheercel. Hieruit blijken zowel qualitatieve als quantitatieve verschillen met het transductiephenomeen bij Salmonella. Eerder beschreven verlies van het converterend vermogen (GROMAN, 1953a) na enige passages van phaag β met C4 in bouillon, hetgeen op transductie zou kunnen wijzen, was te verklaren door ophoping van de virulente mutant B, die niet in staat is conversie teweeg te brengen (GROMAN, 1955; BARKSDALE en PAPPENHEIMER, 1954).

Omtrent het mechanisme van de conversie door bacteriophaag zijn verschillende theorieën opgeworpen, doch staat nog niets vast. Er is overwogen of de ontwikkeling van phaag β uit prophaag het celmetabolisme kan verstoren, zodanig, dat toxine geproduceerd wordt als een abnormaal product, dat bij lysis vrijkomt. Het feit dat geen toxine was aan te tonen in lysaten van bestraalde culturen van C4 (β) (= 444V) pleit hiertegen (BARKSDALE en PAPPENHEIMER, 1954).

Misschien resulteert de aanhechting van de prophaag aan een specifieke 'locus' van de gastheercel in de phaenotypische eigenschap van toxineproductie (GROMAN, 1955). Gezien in het licht van de definitie, die LWOFF (1957) (zie blz. 9) van een prophaag gaf, lijkt dit zeer aannemelijk. Anderzijds is het ook mogelijk, dat deze, erfelijke, eigenschap alleen bij de prophaag aanwezig is, onafhankelijk van het type van de gastheercel.

De phaag c.q. prophaag moet echter een tot nu toe onbekende factor bevatten, daar de aanwezigheid van een phaag alleen niet beslissend is voor het vermogen toxine te produceren, hetgeen blijkt uit het veelvuldig voorkomen van lysogene atoxische stammen. Deze factor houdt waarschijnlijk verband met D.N.A. (CHRISTENSEN, 1957a).

Over het percentage atoxische cellen in een cultuur, die door toevoeging van phaag β toxisch worden, zijn de meningen verdeeld. GROMAN (1953a) vond dat 2—15% van de bacteriën atoxisch blijft. Deze atoxische, niet-lysogene en tegen phaag β resistente bacteriën hadden echter blijkbaar een selectief nadeel ten opzichte van de lysogene, daar ze na overenting van de cultuur niet teruggevonden konden worden (zie ook blz. 49). BARKSDALE en PAPPENHEIMER (1954) konden alleen een hoog conversiepercentage bereiken, indien eerst de virulente phaag B op de cultuur had ingewerkt, waardoor deze atoxische en tegen phaag β, maar niet tegen phaag B resistente bacteriën werden gelyseerd. Werd geen gebruik gemaakt van phaag B, dan bleef $\pm$ 95% van de overlevende bacteriën atoxisch en niet lysogeen. De fractie van een C4-populatie, die gelyseerd wordt door phaag β, bleek constant ($\pm$ 80%), het percentage geconverteerde bacteriën nam af bij een stijgende phaag-bacterie verhouding.

Een beschrijving van de technieken en media om reproduceerbare quantitatieve gegevens te verkrijgen omtrent dit C. diphtheriae-phaagsysteem werd gegeven door GROMAN en LOCKART (1953) en BARKSDALE en PAPPENHEIMER (1954). GROMAN en BOBB (1955) maakten melding van de

remmende werking van het niet-ionische detergens Tween 80 op de adsorptie van phaag β aan C4-bacteriën. Zoals uit de volgende hoofdstukken zal blijken hebben wij bij de opstelling van enige onzer proeven gebruik gemaakt van de in deze publicaties verschafte gegevens.

GROMAN (1955) is de enige geweest, die er, met gebruikmaking van een door BERTANI (1953) bij Sh. dysenteriae toegepaste methode, in slaagde om de niet-lysogene, atoxische stam C4 te isoleren uit een cultuur van de lysogene, toxische stam C4 (β). Hoewel het verkrijgen van (atoxische) niet-lysogene stammen uit toxische, lysogene stammen een van de doelstellingen van ons onderzoek is geweest, hebben wij niet van deze techniek gebruik gemaakt, doch hebben wij een andere weg ingeslagen. De reden hiervoor zullen wij bij de beschrijving van de door ons gebezigde methode uiteenzetten.

GROMAN en EATON (1955) wisten een serologische verwantschap aannemelijk te maken tussen phaag β en een andere phaag, die geen converterend vermogen heeft (γ). Het vermogen tot conversie lijkt dus phaagspecifiek en onafhankelijk van antigene eigenschappen van de phaag. Deze auteurs toonden aan, dat met deze phagen prophaagsubstitutie, dubbele lysogenese en recombinatie mogelijk is. In de dubbel lysogene stam C4 (γ) (β) bleek toxiciteit dominant te zijn.

PARSONS (1955) en GROMAN (1956) beschreven een nieuw phenomeen, namelijk het induceren van toxiciteit bij twee oorspronkelijk atoxische diphtheriestammen met phagen, afkomstig van lysogene atoxische stammen. Andere niet-toxische stammen bleken niet gevoelig voor deze phagen, wel echter voor phagen afkomstig van toxische stammen. Na adaptatie aan de twee eerder genoemde gevoelige stammen kon het infectiespectrum uitgebreid worden met behoud van het vermogen tot conversie. In Hoofdstuk V zullen wij dieper ingaan op de mogelijke verklaringen, die GROMAN voor dit verschijnsel naar voren bracht, nl.

a. mutatie van een phaag met converterend vermogen tot een niet-converterend type;
b. recombinatie van twee niet-converterende typen tot een phaag met converterend vermogen;
c. aanwezigheid van een converterende phaag in een donorstam, maar onderdrukking van de converterende werking.

In verband met deze publicaties moge nog gewezen worden op andere mededelingen betreffende het vóórkomen van lysogene atoxische stammen (FREEMAN, 1951; GROMAN, 1955; GROMAN en EATON, 1955; CHRISTENSEN, 1957a).

Merkwaardig zijn de bevindingen van HEWITT (1954b), die lysogene diphtheriestammen kweekte in aanwezigheid van antibiotica of chemotherapeutica. Door behandeling van een lysogene stam met streptomycine

bleken de betrokken phagen, afgezien van veranderingen in het infectiespectrum, een converterend vermogen te kunnen verkrijgen. Een atoxische, niet voor conversie gevoelige stam bleek op analoge wijze gevoelig gemaakt te kunnen worden voor conversie. HEWITT meende deze resultaten te kunnen verklaren door aan te nemen dat bij deze lysogene stammen twee verschillende phagen aanwezig waren. Door selectieve verwijdering van de meer labiele virussen zouden de stabiele hun invloed kunnen doen gelden op de aard van de bacterie- zowel als van de phaagpopulatie.

HEWITT (1952) bracht de hypothese naar voren dat bij C. diphtheriae de bacteriophaag mogelijk verantwoordelijk is voor het optreden van bacteriële variaties in de natuur. Ten einde deze onderstelling te toetsen werden van een aantal lysogene diphtheriestammen en hun phagen verschillende eigenschappen onderzocht.

Adaptatie van phagen aan bepaalde stammen van C. diphtheriae was in het algemeen eenvoudig. De phaaggevoeligheid en de serologische specificiteit van de onderzochte stammen bleken parallel te lopen, hoewel de phaagspecificiteit groter bleek dan de serologische. Indien conversie mogelijk was hadden toch de phaagresistente mutanten niet alle een gelijk vermogen tot het produceren van toxine, sommige waren atoxisch. Ook bleek het mogelijk mutanten te ontwikkelen met uiteenlopende phaaggevoeligheid.

Het feit dat diphtheriephagen frequent in de natuur voorkomen (vele geïsoleerde diphtheriestammen waren lysogeen) en het van een aantal phagen vastgestelde converterend vermogen kunnen, volgens HEWITT, tezamen zowel de variatie in virulentie van infecterende organismen verklaren, als een bewijs vormen voor de betekenis van atoxische diphtheriebacteriën voor de epidemiologie. Daarom zou het van belang zijn om bij diphtheriegevallen na te gaan of de geïsoleerde stammen lysogeen zijn door een phaag, waarmee zij, oorspronkelijk atoxisch en niet-lysogeen, in contact zijn geweest.

Dezelfde onderzoeker (HEWITT, 1952a) meende bewezen te hebben dat staphylococcenphagen aan diphtheriestammen kunnen worden aangepast (waarmee de grote verscheidenheid van C. diphtheriae stammen werd verklaard). De waarneming, dat een phaag geadapteerd kan worden aan een stam, die lysogeen is voor deze phaag (HEWITT, 1954), gaf echter een betere verklaring voor het optreden van lysis bij een met staphylococcenphaag behandelde diphtheriestam. Deze autoadaptatie bleek ook spontaan te kunnen voorkomen. Door lysis van een cultuur tengevolge van autoadaptatie, het uitgroeien van resistente bacteriën, het opnieuw optreden van autoadaptatie enz. zou een evolutionnaire keten kunnen ontstaan.

Tenslotte willen wij nog wijzen op het werk van FLECK en KOZAK (1958), die, met toepassing van geadapteerde phagen, resistente lysogene diphtheriestammen met veranderde serologische eigenschappen wisten te verkrijgen. De schrijvers achtten deze bevinding epidemiologisch van be-

lang wegens de waarde, die zij toekennen aan antibacteriële immuniteit (vgl. Fleck en Kunicka, 1957).

Indien deze antigene veranderingen, veroorzaakt door een bacteriophaag, veelvuldig in vivo optreden, dan verliezen de resultaten van de in het begin van dit hoofdstuk genoemde experimenten, waarin de beschermende werking werd beschreven van vaccins die bacteriële antigenen bevatten, veel van hun betekenis voor de prophylaxe van diphtherie.

Bij andere bacteriesoorten waren reeds eerder dergelijke antigene structuurveranderingen als gevolg van phaagwerking gezien (Shwartzman, 1928; Burnet en McKie, 1929; Craigie en Brandon, 1936, 1936a; Craigie en Yen, 1938).

Een vergelijking van dit verschijnsel met het conversiephenomeen dringt zich op, doch in hoeverre er hierbij sprake is van een soortgelijk mechanisme, is nog niet nagegaan.

Hoofdstuk III

MATERIAAL EN TECHNIEKEN

A. *Bacterieculturen*

De verschillende stammen van Corynebacterium diphtheriae, waarvan in ons onderzoek gebruik is gemaakt, zijn, behalve de nummers 1, 2, 5, 6, 7, 8 en 9, alle recent, d.w.z. in Mei 1957 of later, geïsoleerd uit diphtheriepatiënten of -dragers. Deze stammen werden geïsoleerd in het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Heerlen *), het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Rotterdam *) en op de afdeling voor Medische Microbiologie van de Rijksuniversiteit te Leiden. Vijf stammen (nummers 5, 6, 7, 8 en 9) mochten wij ontvangen uit het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Utrecht *), terwijl de stammen nummers 1 en 2 afkomstig zijn uit het Department of Microbiology, School of Medicine, University of Washington te Seattle *). De nummers 1 en 2 zijn de stammen C4 en C4(β), waarmee het conversiephenomeen werd aangetoond. Zoals uit de volgende bladzijden zal blijken hebben wij van deze twee stammen gebruik gemaakt om onze technieken te bepalen en te standaardiseren.

Wegens het frequent voorkomen van coccoide en andere, niet typische vormen van C. diphtheriae (waarvan de diagnose vaststaat blijkens de aanwezigheid van het vermogen tot het produceren van toxine) hebben wij ons bij het stellen van de diagnose C. diphtheriae, welke bij de atoxische vormen moeilijkheden kan geven, voornamelijk laten leiden door de biochemische eigenschappen van de bacterie (d.w.z. zuurvorming uit glucose, geen zuurvorming uit saccharose en lactose, reductie van KNO_3 en geen hydrolyse van ureum. Vgl. Topley en Wilson, 1956), meer dan door de voor C. diphtheriae in het algemeen kenmerkend geachte morphologische eigenschappen.

Ofschoon men een zekere variabiliteit van de typen van C. diphtheriae zeker zal moeten aannemen, gezien de vele overtuigende bewijzen die hiervoor geleverd zijn (Christison, 1933; Menton e.a., 1933; Robinson, 1934; Morton, 1940), menen wij toch een indeling in verschillende typen te mogen maken. Het vóórkomen van overgangsvormen en ook het op-

*) Op deze plaats mogen wij Dr. H. Beeuwkes te Heerlen, Dr. J. K. Schönfeld te Rotterdam, Dr. H. P. Lansberg te Utrecht en Dr. N. B. Groman te Seattle, Washington, U.S.A., onze welgemeende dank betuigen voor de bereidwilligheid, waarmee zij ons een aantal stammen van C. diphtheriae ter beschikking hebben gesteld.

TABEL 1

stam-nummer	herkomst	type	toxi-citeit	stam-nummer	herkomst	type	toxi-citeit
1(C4)	Seattle	mitis	—	29	Leiden ; drager	mitis	—
2(C4 (β))	„	„	+	30	Heerlen ; patiënt	gravis	+
5	Utrecht	gravis	+	31	Rotterdam; „	gravisachtig	+
6	patiënten	„	+	32	Leiden ; drager	mitis	—
7	epidemie	„	+	33	„ „	gravis	+
	Amsterdam, 1954			37	Rotterdam; patiënt	„	+
8	Utrecht ; patiënt	„	+	38	Heerlen ; „	„	+
9	„ „	„	+	39	„ „	„	+
10	Heerlen ; „	„	+	40	„ „	„	+
11	„ „	„	+	41	Rotterdam; „	„	+
12	„ „	„	+	43	Leiden ; drager	mitis	—
13	„ „	„	+	44	Rotterdam; patiënt	gravis	+
14	„ „	gravisachtig	+	47	Heerlen ; „	mitis	+
15	„ „	gravis	+	49	Rotterdam; „	gravis	+
16	„ „	„	+	51	„ „	„	+
17	Rotterdam; „	gravisachtig	+	52	„ „	„	+
18	„ „	gravis	+	53	„ „	gravisachtig	+
21	„ „	„	+	55	„ „	„	+
22	Heerlen ; „	„	+	57	„ „	gravis	+
23	Leiden ; drager	mitis	—	58	„ „	„	+
25	Heerlen ; patiënt	gravis	+	59	„ „	„	+
26	„ „	„	+	60	„ „	gravisachtig	+
27	Leiden ; drager	mitis	—	61	Leiden ; drager	mitis	—
28	„ „	gravisachtig	+	62	Heerlen ; „	„	—

Diphtheriestammen, waarvan in het onderzoek gebruik werd gemaakt

treden van typewijziging, hetgeen een enkele maal in vitro is waargenomen (OEDING, 1950), zijn o.i. niet voldoende om het rangschikken van een stam onder een bepaald type, waardoor enige eigenschappen van deze stam tot uitdrukking komen, te verhinderen. Het onderzoek van STOPPELMAN (1948) heeft bovendien bewezen dat weliswaar variaties voorkomen, doch dat bij nauwkeurig onderzoek van de culturele en biochemische eigenschappen de typering in het algemeen geen moeilijkheden behoeft op te leveren.

Voor de indeling in typen hebben wij het aspect van de kolonie op de Claubergplaat, de groeiwijze in bouillon (Heart Infusion Broth, DIFCO) en de omzetting van glycogeen (NUTRIT. BIOCHEM. CORP.) c.q. oplosbaar stijfsel bepalend doen zijn.

Bij de meeste stammen (1 t/m 58) werd zowel de glycogeen- als de stijfselomzetting bepaald. Door 7 van deze stammen (nummers 18, 37, 41, 44, 49, 51 en 52) werd glycogeen niet, stijfsel wel omgezet. Bij de overige stammen kwamen de resultaten van deze bepalingen overeen. Enkele stammen hadden op de Claubergplaat het aspect van de graviskolonie, terwijl geen zuur werd gevormd uit stijfsel en glycogeen. In navolging van STOPPELMAN hebben wij hierbij het haemolytisch vermogen, de kolonievorm bij superisolatie en de groeiwijze in bouillon als criteria aangenomen. Deze stammen werden alle als gravisachtig gequalificeerd, daar laatstgenoemde eigenschappen bij al deze stammen kenmerkend waren voor het gravistype.

De bepaling van het vermogen tot het produceren van toxine geschiedde volgens de onder G beschreven techniek.

In Tabel I hebben wij een overzicht gegeven van de stammen, die ons voor onderzoek ter beschikking stonden.

De stammen werden in de koelcel (+4° C) bewaard op een schuingestolde voedingsbodem van Loeffler in een met een rubberstop afgesloten buis. Het overenten geschiedde iedere 4—6 weken.

B. *Phaagisolatie*

Achtereenvolgens zullen de methoden besproken worden om phagen vrij te maken uit lysogene bacteriën, om bacterievrije phaagsuspensies te verkrijgen en om de aanwezigheid van phagen aan te tonen.

1. Het vrijmaken van phagen uit lysogene bacteriën

Er werd gebruik gemaakt van U.V. bestraling, waarvan LWOFF, SIMINOVITCH en KJELDGAARD (1950) vaststelden dat deze in staat is het vrijkomen van phagen uit lysogene bacteriën, door lysis van deze bacteriën, te bevorderen.

a. Methode volgens HEWITT (1952)

Enige druppels van een H.I.B. cultuur (Heart Infusion Broth, DIFCO) van een diphtheriestam, die als indicatorstam werd gebruikt (de term indicatorstam werd door ADAMS (1950) en BERTANI (1958) in verschillende zin gebruikt; wij bedoelen hiermee een stam, waarop een andere stam op lysogeniteit getest wordt), werden uitgestreken op een bouillonagarplaat (H.I.B., agar 1.5%). Na een half uur drogen bij 37° C werden hierop druppels H.I.B. cultuur van andere stammen geënt.

HEWITT heeft er op gewezen, dat de dosering van de U.V. bestraling nauwkeurig bepaald moet worden omdat een te intense blootstelling aan U.V. de culturen steriliseert of een zo grote bactericide werking heeft dat, in plaats van een confluerende groei van de indicatorstam, er slechts afzonderlijke kolonies optreden, waardoor het niet mogelijk is gebieden met lysis te onderscheiden. Anderzijds zal de U.V. dosis groot genoeg moeten zijn om inducerend te kunnen werken. Daar de stralingsintensiteit van de ons beschikbare U.V. bron niet bekend was, hebben wij, gebruik makend van de stam C4 als indicatorstam en de stam C4 (β) als lysogene stam, getracht de juiste U.V. dosis, d.w.z. de juiste bestralingsduur bij constant gehouden afstand (38 cm) tussen U.V. bron en plaat, te bepalen. Een bestralingstijd van 16 sec. bleek optimaal voor het doen optreden van lysis op de plaats waar de druppel C4 (β) cultuur geënt was. De geringe marge in de optimale bestralingstijd is misschien te verklaren door de door THIBAUT en FRÉDERICQ (1952) gevonden grote U.V. gevoeligheid van diphtheriephagen.

Bij andere pogingen om phagen te isoleren hebben wij deze bestralingstijd van 16 sec. aangehouden. Na incubatie van de aldus met U.V. bestraalde plaat, werd materiaal van de plaats, waar de te onderzoeken stam geënt was, overgeënt in een 2 uur oude cultuur van de indicatorstam in H.I.B., ook in die gevallen waarin het optreden van lysis op de plaat niet duidelijk was. Bij vergelijkende proeven was ons nl. gebleken dat de hoogste phaagtiters in H.I.B. verkregen worden, indien het op phagen te onderzoeken materiaal geënt wordt in een 2 uur oude cultuur van de gevoelige stam, waarna 18—20 uur geïncubeerd wordt; zie ook C. Na 18—20 uur incuberen bij 37° C werd de cultuur afgecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof òf gefiltreerd òf gedurende een half uur in een waterbad van 50° C geplaatst. Gebruik makend van het verschil in weerstand tegen hogere temperaturen tussen diphtheriebacteriën en hun phagen, zullen in het laatste geval eventueel nog in de bovenstaande vloeistof aanwezige bacteriën worden gedood (HEWITT, 1952).

Steriliteitscontrôle, door enting van het aldus behandelde materiaal op Loefflerserum, leerde ons dat soms enige bacteriën een verblijf van een half uur bij 50° C kunnen overleven. Als onderdeel van een methode om de lysogeniteit van een bepaalde stam aan te tonen, achtten wij deze behandeling echter voldoende. Voor het verkrijgen van bacterievrije phaag-

suspensies werd de bovenstaande vloeistof altijd gefiltreerd volgens de op blz. 29 aangegeven methode.

Indien een in dit stadium uitgevoerde proef om phagen aan te tonen negatief uitviel, werd 1 cc van het materiaal opnieuw geënt in een 2 uur oude H.I.B. cultuur van de indicatorstam. Bovenstaande procedure werd tweemaal herhaald, waarna het resultaat van de test op de aanwezigheid van een phaag in het materiaal na de derde passage als definitief werd beschouwd.

Aldus zal, door passage, een tengevolge van de bestraling met U.V. vrijgekomen phaag zich kunnen vermeerderen, tevens zich eventueel kunnen adapteren aan de indicatorstam (vgl. TOSHACH, 1950; FAHEY, 1952; HEWITT, 1952).

b. Methode volgens THIBAUT en FRÉDERICQ (1952)

De methode van HEWITT hebben wij later vervangen door die, welke door bovengenoemde auteurs werd beschreven.

Een 24 uur oude H.I.B. cultuur van een op lysogeniteit te onderzoeken stam werd in een dun laagje (< 1 mm) in een steriele PETRI-schaal gedurende 5 min. bestraald met U.V. De U.V. bron bevond zich op een afstand van 35 cm. Om sedimentatie van de bacteriën te voorkomen werd tijdens de bestraling de schaal voorzichtig heen en weer bewogen. Daar de bacteriën zich nu in een de stralen absorberend medium bevonden, diende de bestralingsduur aanzienlijk langer te zijn dan bij de eerste methode.

Ook in niet bestraalde culturen van lysogene bacteriën kunnen vaak phagen, vrijgekomen door spontane lysis, worden aangetoond. De op de beschreven wijze uitgevoerde U.V. bestraling van de stam C4 (β) leverde echter een phaagsuspensie op met een titer, die het honderdvoudige was van die, verkregen zonder U.V. bestraling, zodat wij meenden deze methode te mogen toepassen bij andere pogingen om diphtheriephagen te isoleren.

Na de bestraling met U.V. werd de cultuur gedurende 1½—2 uur in de broedstoof geplaatst, daar de lysis van een door middel van U.V. bestraling geïnduceerde lysogene bacterie pas plaatsvindt na een 'incubatietijd', waarin de bacterie zich nog 2—4 maal kan delen (LWOFF, SIMINOVITCH en KJELDGAARD, 1950). Deze auteurs vonden voor B. megatherium een 'incubatietijd' van 45—90 min., voor E. coli (phaag λ) wordt 65 min. vermeld (BERTANI, 1958). Voor C. diphtheriae hebben wij een 'incubatietijd' van tenminste 90 min. aangenomen.

De behandeling van het aldus verkregen materiaal was verder gelijk aan die, beschreven onder *a*, na de eerste passage van het te onderzoeken materiaal in een H.I.B. cultuur van de indicatorstam.

Deze methode heeft het voordeel dat, indien het inderdaad een lysogene stam betreft, waarvan de phaag in staat is de gebruikte indicatorstam te

lyseren, de titer van de verkregen phaagsuspensie ook zonder passage hoog zal kunnen zijn vergeleken met die, verkregen volgens de onder *a* beschreven methode. Indien er echter nog een zekere adaptatie aan de indicatorstam moet plaatsvinden, dan zal men in het gunstigste geval ook met deze methode slechts enkele plaques kunnen vinden, wanneer geen passages worden gedaan.

In ons materiaal waren er slechts twee phagen, waarvan wij de aanwezigheid op deze wijze, zonder passage, konden aantonen (zie blz. 46).

Een andere vaak toegepaste test op lysogeniteit bestaat uit het enten van een druppel te onderzoeken materiaal op een op een plaat uitgestreken indicatorstam, zonder U.V. bestraling. Het ontstaan van waarneembare lysis wordt dan als criterium aanvaard (vgl. FISK, 1942) voor de aanwezigheid van een op deze indicatorstam werkzame phaag. Uit het bovenstaande moge duidelijk geworden zijn, dat deze methode, waarvan wij geen gebruik maakten, slechts in sommige gevallen resultaten zal kunnen opleveren. Ook BERTANI (1958) heeft hierop gewezen.

Een test op lysogeniteit, die bestaat uit het enten van het op phaag te onderzoeken materiaal tezamen met de indicatorstam in uit agar geponste gaten (GROMAN, 1953a), heeft het bezwaar dat ook dan geen duidelijke conclusie kan worden getrokken, indien het gematigde phagen betreft. In dat geval zal een zo sterke groei van resistente (lysogeen geworden) bacteriën kunnen optreden, dat deze niet te onderscheiden is van de contrôlecultuur, waaraan geen phaagmateriaal is toegevoegd.

2. Bereiding van bacterievrije phaagsuspensies

Voor het verkrijgen van bacterievrije phaagfiltraten worden in de literatuur verschillende filters aanbevolen. FREEMAN (1951) werkte met SEITZ EK filters. Hij vermeldde niet in hoeverre hierbij verlies van phagen optrad. HEWITT (1952) meende, dat de lytische activiteit van de phaag verloren gaat door filtratie door een SEITZ filter of door een CHAMBERLAND L3 kaars. Deze auteur gebruikte gradocolmembranen met een gemiddelde poriediameter van 0.5—0.7 μ. GROMAN en LOCKART (1953) gebruikten òf glasfilters (UF) òf CHAMBERLAND L3 kaarsen. Met glasfilters verkregen zij 50—80% opbrengst, met de CHAMBERLANDfilter 30—60%. Bij het zoeken naar een geschikte filter bleek ons, dat filtratie door SEITZ EK- of CHAMBERLANDfilters een groot materiaalverlies opleverde, indien met kleine hoeveelheden (5—10 cc) werd gewerkt. De toepassing van gradocolmembranen heeft dit bezwaar niet, doch het werken hiermee bleek nogal omslachtig. Bovendien zijn deze membranen erg teer, zodat de filtratie in vele gevallen herhaald moest worden wegens het scheuren van de membraan.

Glasfilters echter bleken goed te voldoen. Wij maakten gebruik van JENAER GANZGLAS-BAKTERIENFILTER 3G5m. De met deze filters verkregen phaagfiltraten waren altijd bacterievrij blijkens de geregeld uitgevoer-

de contrôle door enting op Loefflerserum. Verlies door filtratie was niet aantoonbaar, indien de filter tevoren werd behandeld met 10 cc H.I.B. Een waterstraalpomp was voldoende om in enige min. 5—10 cc afgecentrifugeerd materiaal door te zuigen.

3. Het aantonen van de aanwezigheid van phagen

Op eenvoudige wijze kan de aanwezigheid van phagen aangetoond worden met de methode van Fisk (1942) (zie 1). Deze methode is echter niet toereikend, indien de titer van de phaagsuspensie laag is. Bovendien zal de vorming van veel resistente (lysogene) bacteriën belemmerend kunnen werken op het ontstaan van waarneembare lysis, indien het een gematigde phaag betreft.

Wij hebben daarom gebruik gemaakt van de methode, die Gratia (1936) als eerste beschreef. Afgezien van enige kleine wijzigingen in de hoeveelheden van het gebruikte materiaal, hebben wij het voorschrift gevolgd, dat Adams (1950) en Groman en Lockart (1953) voor deze methode gegeven hebben. De media waren die, welke laatstgenoemde onderzoekers toepasten bij hun studie van de phaag-bacterie betrekkingen bij C. diphtheriae.

Wij verrichtten de proef als volgt: Bij 1 cc op phagen te onderzoeken materiaal werd 0.2 cc van een verse H.I.B. cultuur van de indicatorstam ($\pm$ 10^8 bacteriën/cc) gevoegd. Het mengsel werd 30 min. geïncubeerd bij 37° C (adsorptieperiode) en vervolgens overgepipetteerd in een buis met 3 cc gesmolten en tot 46° C afgekoelde H.I.B. agar 0.7%. De inhoud van deze buis werd daarna gegoten op een bij 37° C voorverwarmde agarplaat (15 cc H.I.B. agar 1.5%). Wanneer door afkoelen de bovenste, zachte agarlaag gestold was, werd de plaat een nacht geïncubeerd bij 37° C. Waren op deze indicatorstam werkzame phagen in het onderzochte materiaal aanwezig, dan waren de daardoor gevormde plaques te zien als meer of minder donkere (afhankelijk van de virulentie van de phaag) gaten in een helder verlichte bacterielaag (plaat 1), wanneer de plaat bekeken werd in een donkerveld-kolonieteller.

Voordelen van deze methode zijn, dat de bacteriën en viruspartikels gelijkmatig verdeeld worden over het oppervlak van de plaat en tevens, dat een grotere hoeveelheid materiaal (1 cc) op phagen onderzocht kan worden.

In de zachte agarlaag kan een snelle diffusie van phaagpartikels plaatsvinden, waardoor grotere plaques gevormd kunnen worden. De kansen op adsorptie van de phagen aan de bacteriën zullen in het bouillonmedium tengevolge van snellere diffusie groter zijn dan op een plaat.

Barksdale en Pappenheimer (1954) adviseerden om de bouilloncultuur van de indicatorstam, die voor de proef van Gratia zal worden gebruikt, in een schudrek te incuberen. De neiging van diphtheriebacteriën om in klompjes te groeien zou hierdoor verminderen, waardoor grotere

plaques verkregen kunnen worden, terwijl dan ook bacterietellingen, uitgevoerd volgens de gietplaat-methode, betrouwbaar zouden zijn. Uit vergelijkende proeven bleek ons, dat door de indicatorstam 15 min. te schudden voor gebruik grotere plaques ontstaan dan wanneer niet geschud werd, doch dat dit geen verschil maakte met het resultaat na incubatie in een schudrek gedurende 20 uur. Wij hebben daarom de cultuur van de indicatorstam 15 min. geschud voor gebruik in de proef, indien deze werd gedaan om een geïsoleerde phaag aan te tonen. Bij titraties van phagen, waarvan de plaquegrootte bekend en voldoende was (door adaptatie), hebben wij het schudden achterwege gelaten, ook omdat grotere plaques, door een meer frequent conflueren, het tellen kunnen bemoeilijken.

Hoewel tijdens het onderzoek bleek, dat de in de proef gebruikte bacterieconcentratie niet van essentieel belang was voor het verkrijgen van een betrouwbaar resultaat (ook GROMAN en LOCKART vonden een ruime marge voor de optimum concentratie), hebben wij toch getracht deze in de verschillende experimenten min of meer constant te houden.

Een 20 uur oude H.I.B. cultuur van een mitisstam, verkregen door enting van 5 druppels van een vorige 20 uur oude H.I.B. cultuur, had een concentratie van $\pm$ 10^8 bacteriën/cc, welke geschikt was voor het gebruik in de proef. Bij de bepaling van deze concentratiewaarden in een extinctiometer bleek, dat deze nooit meer dan een factor 2 verschilden van 10^8 bacteriën/cc. De extinctiewaarden waren eerder vergeleken met bacterieconcentraties, die bepaald waren volgens de gietplaatmethode. Gezien de neiging van C. diphtheriae om in klompjes te groeien moet hier, evenals in het werk van GROMAN en LOCKART, eigenlijk gesproken worden over concentratie van bacterieklompjes.

C. *Bereiding van phaagsuspensies met hoge titer. Phaagtitratie*

ADAMS (1950) heeft er op gewezen dat geen vast schema te geven is voor het opvoeren van de phaagtiter in bouillon, daar de aard van de phaag zowel als van de bacterie hierbij een rol spelen.

Door een serie vergelijkende proeven zijn wij tot de conclusie gekomen dat de phaagtiter snel opgevoerd kan worden door hetzij plaquemateriaal, hetzij een druppel phaagsuspensie met lage titer uit een vorige passage in een twee uur oude, in de logarithmische groeiphase verkerende H.I.B. cultuur van de gevoelige stam (verkregen door enting van 5 druppels van een bacteriecultuur met een concentratie van $\pm$ 10^8 bacteriën/cc) te enten en na 20 uur incubatie het phaagfiltraat te bereiden. De beginconcentratie van de bacteriën was dan altijd hoger dan de begintiter van de phaag, tot deze laatste waarden heeft bereikt van 10^7. De titers werden uitgedrukt in plaquevormende eenheden/cc. Een lage infectiemultipliciteit bevorderde de phaagvermeerdering.

Door passage in H.I.B. waren aldus titers te bereiken van 10^6—10^7. De

troebeling van de bouillon na incubatie bleek geen maat voor de phaagtiter. Ook indien geen verschil in troebeling te zien was met een alleen met bacteriën beënte buis, werden soms phaagtiters gevonden van 10^7 (vgl. ADAMS, 1950).

Ten einde hogere phaagtiters te verkrijgen werd gebruik gemaakt van de methode, die SWANSTROM en ADAMS (1951) beschreven. Een phaagbacteriemengsel, waarin de phaagconcentratie zodanig was, dat op een plaat juist confluerende lysis (10^5—10^6/cc) optrad, werd volgens de methode van GRATIA op een H.I.B.-agarplaat geënt. Na incubatie werd de zachte agarlaag afgeschrapt en de phaag hieruit geëxtraheerd met 5 cc H.I.B. Wij deden dit door de zachte agar eerst in een mortier te verwrijven en daarna de H.I.B. toe te voegen. De phaagtiter bleek dan tenminste het honderdvoudige van die, welke verkregen werd met dezelfde methode, waarbij het verwrijven achterwege gelaten werd. De aldus verkregen suspensie werd tweemaal afgecentrifugeerd om het verstoppen van de filter door agardeeltjes te voorkomen, en vervolgens gefiltreerd. De hoogste phaagtiter die wij met deze methode bereikten bedroeg 4.10^9.

Het verkrijgen van een maximale phaagtiter is afhankelijk van het aantal bacteriën, dat geproduceerd kan worden vóór alle bacteriën gelyseerd zijn. Een te hoge bacterieconcentratie heeft een verminderde hoeveelheid per bacterie vrijgemaakte phaag tot gevolg; te weinig bacteriën leveren minder phaagdeeltjes op, omdat alle bacteriën dan vroegtijdig gelyseerd worden. Hieruit blijkt, dat de voedingstoestand van de bacteriën een rol speelt: bij 'verhongering' vinden minder delingen plaats, er komen dus minder phagen vrij. De optimale phaagconcentratie is die, waarmee juist confluerende lysis ontstaat. Deze is dus mede afhankelijk van de grootte van de gevormde plaques. Bij te hoge bacterie- zowel als phaagconcentraties zal bovendien later readsorptie van phagen aan nog niet gelyseerde bacteriën optreden, waardoor de phaagproductie verminderd wordt (SWANSTROM en ADAMS, 1951).

De titers van phaagfiltraten werden bepaald volgens de methode van GRATIA. Indien het phaagfiltraten met hoge titers betrof, werden de titers berekend uit de resultaten van de titratie van 10-voudige verdunningen in H.I.B. Afhankelijk van de grootte van de plaques konden reproduceerbare titerwaarden verkregen worden bij een aantal plaques van 50—2000 à 10.000 per plaat.

Uit het feit, dat titratie van 10-voudige verdunningen in H.I.B. bij gelijke proefomstandigheden evenredige titerwaarden opleverde, mag geconcludeerd worden dat een plaque gevormd werd door één phaagpartikel en dat het aantal plaquevormende eenheden evenredig was met het aantal phaagpartikels (vgl. DULBECCO, 1952). De verhouding tussen beide — 'efficiency of plating' — is onder meer afhankelijk van de samenstelling van de media (ADAMS, 1950). GROMAN en LOCKART (1953) stelden vast dat, behalve wijzigingen in de hoeveelheden van de agarlagen, de adsorp-

tietijd in H.I.B. invloed heeft op het aantal gevormde plaques. Bij de phaagtitraties hielden wij ons daarom aan een constante adsorptietijd van 15 min.

Bij vergelijkende titraties (zoals bij de neutralisatieproeven met antiphaagsera) werd gebruik gemaakt van dezelfde H.I.B. cultuur van de indicatorstam.

D. *Het bewaren van phaagfiltraten*

Groman en Bobb (1955) bewaarden phaagfiltraten (phaag B) in van de lucht afgesloten buisjes bij —70° C. Gedurende 5 maanden bleef de titer dan constant, bij +4° C daalde de titer snel binnen een week. Daar wij niet de beschikking hadden over een diepvrieskast met een temperatuur van —70° C hebben wij nagegaan in hoeverre de phaagtiter op peil blijft, indien de filtraten in luchtdicht afgesloten buisjes bewaard worden bij —35° C. Fig. 1 toont duidelijk aan, dat het bewaren van de filtraten bij +4° C de voorkeur verdient boven het invriezen bij —35° C.

Uit het feit dat de curven, na een initiële snellere daling van die curve, welke de titerdaling van het bij —35° C bewaarde materiaal weergeeft, parallel lopen, hebben wij de conclusie getrokken, dat het eenmaal invriezen en ontdooien de oorzaak was van de lagere titerwaarden, die hierbij gevonden werden.

De door ons bereide phaagfiltraten werden daarom in de koelcel (+4° C) in luchtdicht afgesloten buizen bewaard. De titerdaling, die ook dan optrad, noopte ons om geregeld, d.w.z. iedere 4—6 weken, nieuwe phaagfiltraten met hoge titer te bereiden.

E. *Bereiding van phaagresistente, lysogene stammen*

Om uit een phaaggevoelige stam lysogene culturen te kunnen bereiden, dienden wij te beschikken over phaagfiltraten, waarvan de titer voldoende hoog was om, bij enting in een H.I.B. cultuur van een gevoelige stam, na incubatie een goed gegroeide lysogene cultuur te kunnen opleveren. De hoogte van deze titer is mede afhankelijk van de initiële bacterieconcentratie; de op blz. 32 genoemde voorwaarden om maximale phaagtiters in bouillon te verkrijgen, gelden ook gedeeltelijk voor een maximale lysogenisatie. Een lage initiële bacterieconcentratie zal alleen een ander gevolg hebben nl. een lage eindconcentratie van — lysogene — bacteriën. De factoren, die de lysogenisatie bevorderen, kunnen echter verschillen en zijn afhankelijk van de aard van de phaag (Bertani, 1958). In de practijk bedroeg de phaagconcentratie $\pm 10^3$/cc.

Wij kwamen hier voor een moeilijkheid te staan, daar alleen passage op de gevoelige stam tot hogere phaagtiters kan leiden, terwijl het aldus pas-

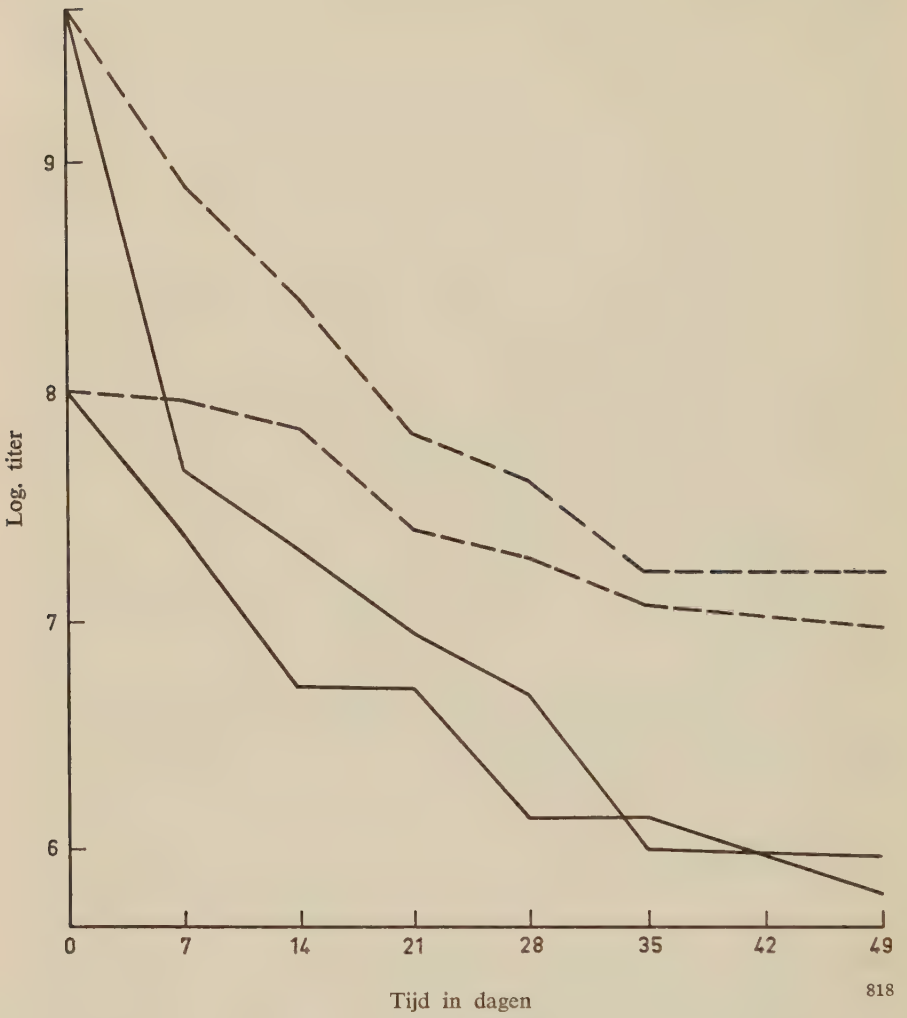


Fig. 1. Phaagtiterdaling - - - indien de phaagfiltraten bij + 4° C bewaard werden
— indien de phaagfiltraten bij —35° C bewaard werden

seren van de phaag een kans inhoudt op het virulenter worden van de phaag (vgl. GROMAN en EATON, 1955). Zo konden wij ervaren, dat na 8—10 passages van de geïsoleerde phagen op de gevoelige stam phaagfiltraten verkregen werden, die na 24 uur incubatie volledige opheldering gaven van de H.I.B. culturen van de gevoelige stam. Wel kwam dan soms nog secundaire groei voor, doch de lysogeniteit hiervan kon niet aangetoond worden (vgl. de verhouding phaag β — phaag B).

Meestal hield de phaagisolatietechniek reeds drie passages van een phaag op de gevoelige stam in, zodat wij gedwongen waren gebruik te maken van phaagfiltraten, verkregen na enige passages. De plaques, die door deze phagen gevormd werden, waren echter troebel, terwijl bouillonculturen van de gevoelige stam niet opgehelderd werden door deze phagen. Daar wij meenden, dat deze phagen daarom nog als gematigd konden worden beschouwd, hebben wij deze gebruikt voor de bereiding van de lysogene stammen.

FREEMAN (1951) entte na elkaar bacteriën en phaagfiltraat op een H.I.B. agarplaat. De na incubatie ontstane groei bleek lysogeen en toxisch te zijn. Hij verkreeg dezelfde resultaten na enting van bacteriën en phagen in H.I.B. Hoewel de bereiding van deze lysogene culturen eenvoudig lijkt, vonden BARKSDALE en PAPPENHEIMER (1954) een hoog percentage atoxische, niet-lysogene bacteriën in de tegen phaag β resistente cultuur. De zuivere lysogene stam verkregen deze onderzoekers door het toevoegen van de virulente phaag B (zie blz. 20).

Wij hebben deze drie methoden alle toegepast, met in zoverre goede resultaten, dat de lysogeniteit van de verkregen resistente culturen kon worden aangetoond. Wij hebben echter niet kunnen vaststellen of in deze culturen nog niet-lysogene resistente bacteriën aanwezig waren. Alleen bij de tegen phaag β resistente C4-cultuur was dit eenvoudig, daar de toxiciteit van iedere kolonie bepaald kon worden op de P.P.S.A.-plaat (zie blz. 40). Inderdaad konden in deze cultuur atoxische en niet-lysogene klonen worden gevonden. Procentueel was dit echter zeker geen 95% zoals BARKSDALE en PAPPENHEIMER opgaven. Na enige passages konden de atoxische klonen niet meer worden aangetoond, zodat onze waarnemingen meer in overeenstemming zijn met die van GROMAN (1953a).

Wij bepaalden de lysogeniteit van de resistente culturen door de inducerende werking van U.V. bestraling na te gaan: de hoeveelheid vrijgekomen phagen na U.V. bestraling werd vergeleken met die, welke zonder U.V. bestraling in overigens dezelfde proefomstandigheden verkregen werd. Deze bepaling werd aldus gedaan om te voorkomen dat het aantonen van phagen, die nog aanwezig waren na de bereiding van de resistente cultuur, als bewijs zou worden beschouwd voor de lysogeniteit van de resistente bacteriën. Betrof het meegeënte phagen, dan zouden geen verschillen moeten worden gevonden bij de vergelijking van de resultaten van de twee bepalingen, misschien zelfs lagere waarden voor de filtraten verkregen uit de met U.V. bestraling behandelde culturen (vgl. THIBAUT en FRÉDERICQ, 1952).

Het isoleren van aparte kolonies ten einde te trachten aldus zuivere lysogene stammen te verkrijgen, heeft bij C. diphtheriae niet veel zin, daar de kolonies uit bacterieklompjes worden gevormd en er dus de kans blijft bestaan, dat in één kolonie een mengsel voorkomt van lysogene en niet-lysogene, resistente bacteriën.

F. *Bereiding en toepassing van antiphaagsera*

In grote lijnen werd het voorschrift, dat ADAMS (1950) hiervoor gaf, gevolgd.

ADAMS raadde aan om tenminste 3 konijnen te immuniseren, enerzijds wegens variaties in de uiteindelijke antistoftiter bij verschillende dieren, anderzijds als veiligheidsmaatregel tegen het verlies van dieren door intercurrente sterfte. Uit economische overwegingen immuniseerden wij 2 in plaats van 3 konijnen met elk antigeen. De titers van de als antigeen gebruikte phaagsuspensies konden niet voldoen aan de eis van 10^{10} plaquevormende deeltjes/cc, daar de hoogste titer, die wij bereiken konden, 4.10^9 bedroeg (phaag B). Het bezwaar van nog lagere maximaal bereikbare titers van de filtraten van enkele phagen hebben wij gedeeltelijk ondervangen door de per injectie ingespoten hoeveelheid materiaal te vergroten. De toepassing van een adiuvans (polyvinyl-pyrrolidon) bleek geen gunstigere resultaten op te leveren dan wanneer dit achterwege gelaten werd. De per keer ingespoten hoeveelheid phagen varieerde, afhankelijk van de titers van de beschikbare filtraten, van 5.10^6 (enige malen was de titer van een filtraat van phaag 16/1 zeer laag) tot 5.10^9 (phaag B); deze hoeveelheid varieerde bij één konijn echter nooit meer dan het tienvoudige.

Indien een phaag, waartegen serum bereid moest worden, in staat was tot conversie, en ook indien dit niet bekend was, dan werd diphtherieantitoxine (50—100 E/cc) toegevoegd aan het te injiciëren filtraat om eventueel hierin aanwezig toxine te neutraliseren.

Voor de injecties, die om de 5 of 7 dagen plaatsvonden, werd de subcutane weg gekozen. Minstens 8, soms 10 injecties waren nodig om serum met een voor neutralisatieproeven voldoende hoge titer te verkrijgen.

Een week na de 6e, respectievelijk 8e en 10e injectie werd de antiphaagtiter van het serum, verkregen na stollen en afcentrifugeren van bloed uit de marginale oorvene van het betreffende konijn, bepaald. Evenals GROMAN en EATON (1955) vermochten wij geen sera met hoge titers van phaagneutraliserende antistoffen te verkrijgen. De oorzaak hiervan kan gezocht worden in de relatief lage phaagdoses, die de konijnen ingespoten kregen, maar ook in een geringere antigene potentie van diphtheriephagen dan van coliphagen, waartegen wel antiphaagsera met hoge neutralisatietiter te bereiden zijn.

Wij hebben gemeend de sera in neutralisatieproeven te mogen gebruiken, indien bij een serumverdunning van 1/10 en een neutralisatietijd van 30 min. minstens 90% neutralisatie optrad van de homologe phaag. De sera werden zonder conservantia bewaard bij —20° C.

De reactie tussen phaag en antistof vindt niet onmiddellijk plaats na het mengen van serum en phaagfiltraat, doch verloopt met een snelheid, die afhankelijk is van de phaagconcentratie, van de concentratie en activi-

teit van de antistoffen, en van de temperatuur (ADAMS, 1950).

Empirisch is bewezen, dat de snelheidsconstante (K) van deze reactie bij constante temperatuur te berekenen is uit de formule:

$$K = 2.3\ D/t\ .\ \log\ p_o/p\ ,$$

waarin p_o = phaaghoeveelheid vóór het begin van de reactie,
p = phaaghoeveelheid op tijdstip t (min. sinds het begin van de reactie),
D = eindverdunning van het serum in het phaagserummengsel (HERSHEY, KALMANSON en BRONFENBRENNER, 1943).

ADAMS (1950) meende, dat deze formule geldt, indien 90—99% van de phaag in het reactiemengsel geïnactiveerd wordt. Hoewel HERSHEY en medewerkers een ruimere toepassing van de formule verantwoord achtten (minimaal 50% neutralisatie), hebben wij alleen de K-waarden van de sera t.o.v. een aantal phagen berekend, indien tenminste 90% en maximaal 99% neutralisatie optrad.

Met behulp van de K-waarden kan een eventuele serologische verwantschap tussen verschillende phagen worden aangetoond. Deze verwantschap tussen twee phagen mag aangenomen worden, indien de K-waarden van tegen één phaag bereid serum voor beide phagen gelijk of bijna gelijk zijn (ADAMS, 1950).

Het protocol van de door ons verrichte neutralisatieproeven zag er als volgt uit:

Bepaling van p	Bepaling van p_o
(a) 0.1 cc phaagfiltraat (10^6—10^7/cc)	(a′) 0.1 cc phaagfiltraat (10^6—10^7/cc) (idem als bij (a))
0.7 cc H.I.B.	0.9 cc H.I.B.
0.2 cc antiphaagserum (= serumverdunning 1/5)	
c.q. 0.1 cc phaagfiltraat (10^6—10^7/cc)	
0.8 cc H.I.B.	
0.1 cc antiphaagserum (= serumverdunning 1/10)	

Incuberen gedurende 5, 10 of 15 minuten bij 37° C

(b) 0.1 cc (a)	(b′) 0.1 cc (a′)
9.9 cc H.I.B.	9.9 cc H.I.B.
(c) 0.1 cc (b)	(c′) 0.1 cc (b′)
0.9 cc H.I.B.	0.9 cc H.I.B.
0.2 cc H.I.B. cultuur van de indicatorstam (± 10^8 bact./cc)	0.2 cc H.I.B. cultuur van de indicatorstam (± 10^8 bact./cc)

Enten volgens de methode van GRATIA

18—20 uur incuberen bij 37°	18—20 uur incuberen bij 37° C
Plaquetelling	Plaquetelling
10^{-3} (= totale verdunning). p	10^{-3} (= totale verdunning). po

De overentingen van (a) naar (b), en van (b) naar (c) dienen als verdunningen om de neutralisatiereactie te beëindigen.

Met een viertal normale konijnesera kon geen phaagneutralisatie worden aangetoond.

G. *Toxiciteitsbepaling van diphtheriestammen*

Voor de bepaling van het vermogen van diphtheriestammen om toxine te produceren hebben wij gebruik gemaakt van een modificatie van de methode van ELEK (1948). De betrouwbaarheid van deze methode en van de hiervan door OUCHTERLONY (1949) afgeleide methode is door verscheidene onderzoekers nagegaan (o.a. KING, FROBISHER en PARSONS, 1949; FROBISHER, KING en PARSONS, 1951; SUSLOVA, 1956; KRUTOVA, 1956; KRÖGER, 1957).

Ook werden wijzigingen in techniek en voedingsbodem aangebracht (KING, FROBISHER en PARSONS, 1949; FROBISHER, KING en PARSONS, 1951; BEEUWKES en BROUWERS, 1954; GROSS en HUSSELS, 1958) om de resultaten gunstig te beïnvloeden.

In het algemeen is de conclusie, dat deze methoden redelijk betrouwbaar zijn. Toch worden ook foutieve resultaten vermeld. Zo vonden FROBISHER, KING en PARSONS (1951), dat van sommige minimusstammen (deze stammen, die kleine kolonies vormen en glucose niet omzetten by $p_H = 7.8$, geven zeer zwakke reacties na intracutane enting bij konijnen), waarvan de toxiciteit bleek uit de reactie na intracutane enting bij konijnen, de toxiciteit in vitro niet kon worden aangetoond; KRÖGER (1957) beschreef twee mitisstammen, die eerst in vitro atoxisch leken, doch na enige overentingen wel precipitatielijnen te zien gaven.

De door ons toegepaste modificatie hebben wij daarom ook niet als voor 100% betrouwbaar willen beschouwen. Alle negatieve en dubieuze resultaten van de toxiciteitsbepaling werden gecontroleerd door middel van een dierproef.

De toxiciteitsproef in vitro werd verricht als volgt:

Het agarmedium bestond uit:	PROTEOSE PEPTONE (DIFCO)	2.0
	GRANULATED AGAR (DIFCO)	1.5
	NaCl	0.25
	aq. dest.	100.—
	(FROBISHER, KING en PARSONS, 1951)	$p_H = 7.8$

Na autoclaveren en afkoelen tot 46° C werd 20% steriel paardeserum

toegevoegd. Vervolgens werden de platen gegoten (± 24 cc/plaat). Deze platen bleven, bij 4° C bewaard, gedurende 2—3 weken geschikt voor gebruik.

Niet elk paardeserum bleek bruikbaar voor de toxiciteitsproef in vitro. Geringe antitoxineconcentraties in het serum zullen het serum zeker ongeschikt kunnen maken. Waarschijnlijk spelen ook andere, onbekende, factoren een rol. Door het testen van monsters uit iedere beschikbare fles serum werd een voor de proef geschikt serum gekozen.

In een steriele PETRI-schaal werd op een steriel strookje filtreerpapier (EDEROLKWALITEIT A GLATT Fa. HOFFMAN, ROTTERDAM) van 6 x 1½ cm met phys. NaCl tot 1000 E/cc verdund antitoxine (R.I.V.) gedruppeld. Na afdruipen werd dit strookje op de proteosepeptonserum (P.P.S.) voedingsbodem gelegd. Hiervóór werden de platen gedurende een half uur met half open deksel in de broedstoof geplaatst om condenswater op het medium te laten verdampen.

(Volgens ELEK's methode worden de platen pas gegoten vóór gebruik. Het filtreerpapiertje met antitoxine wordt dan door de nog vloeibare agar heen op de bodem van de schaal gedrukt. De modificatie heeft het voordeel, dat de platen voor gebruik gereed zijn en dat er niet bij iedere bepaling verse platen gegoten behoeven te worden.)

Wij entten vervolgens de op toxiciteit te onderzoeken stammen beiderzijds van het strookje filtreerpapier in strepen loodrecht hierop. Met een vol entoogje van een op Loefflerserum gegroeide cultuur werd één streep geënt. Dit nogal zwaar enten had het voordeel van het vroeg, d.w.z. meestal binnen 24 uur, doen verschijnen van de specifieke precipitatielijnen, slechts een enkele maal moest hiervoor 48 uur gewacht worden. Het nadeel van het soms ook vroeger (d.w.z. vroeger dan de in de literatuur vermelde 48—72 uur na enten) verschijnen van de aspecifieke, door andere antigeen-antilichaamsystemen dan het toxine-antitoxinecomplex gevormde lijnen was niet groot, omdat wij beschikten over de stammen C4 en C4 (β) als negatieve en positieve contrôles. Daar de antigene eigenschappen van deze twee stammen, afgezien van het toxine van de stam C4 (β), identiek geacht konden worden, was, door deze stammen als contrôles mee te enten, met zekerheid vast te stellen, welke de precipitatielijn was, die gevormd werd door het toxine-antitoxinecomplex.

Het resultaat van een toxiciteitsbepaling, die na 24 uur afleesbaar was en waarbij geen aspecifieke lijnen te zien waren, toont Plaat 2. In Plaat 3 is de toxine-antitoxinelijn te zien als die precipitatielijn, welke de stammen C4 en C4 (β) niet gemeen hebben. Plaat 4 tenslotte, laat zien hoezeer het vóórkomen van meer precipitatielijnen het vaststellen van de toxiciteit van een bepaalde stam toch kan bemoeilijken.

Was het resultaat van de bepaling niet te beoordelen, dan werd de proef herhaald. Was ook dan geen conclusie te trekken, dan deden wij,

evenals in de gevallen, waarin de in vitro-proef een duidelijk negatief resultaat gaf, een caviaproef volgens RÖMER (1909). Hiertoe werd 0.2 cc van het in 0.5 cc phys. NaCl gesuspendeerde sediment van een 24-uur oude H.I.B. cultuur van de betreffende stam bij een cavia intracutaan in de flank, die over een oppervlakte van 5 x 5 cm was geschoren, ingespoten. Een contrôlecavia kreeg bovendien 500 E antitoxine intraperitoneaal. Het gelijktijdig inspuiten van het antitoxine bij het contrôledier gaf een even goede neutralisatie van eventueel door de te onderzoeken stam geproduceerd toxine als wanneer dit 24 uur tevoren geschiedde.

In geen enkel geval echter, waarin de toxiciteitsproef in vitro een negatief resultaat gaf was toxineproductie aan te tonen door middel van de caviaproef.

Om uit een cultuur, die mogelijk bestond uit een mengsel van toxische en atoxische bacteriën (zie Hoofdstuk IV: G) op eenvoudige wijze een atoxische kloon te isoleren werd gebruik gemaakt van de methode, die GROMAN (1953a) toepaste om de percentages toxische en atoxische tegen phaag β resistente bacteriën in een met deze phaag behandelde C4-cultuur te bepalen.

Met een entoogje werd uit een te onderzoeken bouilloncultuur geënt op een voedingsbodem (P.P.S.A.), die bestond uit 20 cc proteosepeptonagar (zie blz. 38), 2 cc paardeserum en 50 E antitoxine, en die enige uren tevoren bereid was. Na 2 dagen incuberen, gevolgd door enige dagen bij $+4°$ C, waren halo's waar te nemen rondom de kolonies, die bestonden uit toxine producerende bacteriën. Kolonies van atoxische bacteriën toonden deze halo's niet.

De halo wordt, evenals de precipitatielijnen in de proef van ELEK, gevormd door een precipitatiereactie van toxine en antitoxine. Hogere paardeserumconcentraties van het medium remden de bacteriële groei. Bevatte het medium 100 E antitoxine of meer, dan waren na incubatie geen halo's te zien. Men moet aannemen, dat die toxine-antitoxineconcentratieverhouding, welke leidt tot precipitaatvorming, dan onder de kolonie aanwezig is. Lagere antitoxineconcentraties dan 50 E per plaat bleken wel aanleiding te kunnen geven tot halovorming, doch de halo's waren dan moeilijker te onderscheiden. Halovorming door aspecifieke precipitatiereacties hebben wij niet waargenomen. Waarschijnlijk was de antitoxineconcentratie van het medium daar te laag voor.

Plaat 5 geeft een beeld van een gedeelte van een op de hierboven beschreven wijze bereide plaat, waarop een te onderzoeken stam geënt was. Temidden van een aantal toxische, halo-vormende kolonies is een atoxische kolonie zonder halo te zien.

Een langs deze weg geïsoleerde 'atoxische' kloon werd na passage nog eens op toxiciteit onderzocht door middel van de gewijzigde proef van ELEK of de caviaproef. Uit deze contrôles bleek, dat de methode zeker niet voor 100% betrouwbaar is. Ter oriëntatie was zij voor ons echter

van grote waarde, daar het overenten van kolonies op Loefflerserum, en de toxiciteitsbepaling van deze klonen, nu tot een klein aantal beperkt kon blijven.

H. *Bepaling van de invloed van U.V. bestraling op culturen van C. diphtheriae.*

Ten einde het bactericide effect van U.V. bestraling op lysogene en niet-lysogene diphtheriestammen te bepalen (zie Hoofdstuk IV: F) hebben wij twee methoden toegepast:

a. 5 cc van een 24-uur oude H.I.B. cultuur werd in een PETRI-schaal aan U.V. bestraling blootgesteld (zie B: 1b). Na 5, 10 en 15 minuten U.V. bestraling werd een monster van 0,1 cc afgenomen. Verdunningen (10^{-3} of 10^{-4}) van deze monsters werden op een H.I.B. agarplaat geënt volgens de methode van GRATIA. Na een nacht incuberen werden de kolonies geteld en hieruit de concentraties van de bacteriën berekend, die 5, 10 of 15 minuten U.V. bestraling overleefd hadden. Deze bacteriële concentraties werden vergeleken met die van de H.I.B. cultuur vóór de bestraling.

b. Verdunningen (10^{-2}, 10^{-3} of 10^{-4}) van een 24-uur oude H.I.B. cultuur werden, 0.1 cc per plaat, op vier H.I.B. agarplaten uitgestreken en vervolgens respectievelijk 0, 50, 100 en 150 seconden bestraald met U.V. (zie B: 1a). Na een nacht incuberen werden de kolonies geteld en de percentages overlevende bacteriën berekend.

De verdunningen van de H.I.B. culturen werden bij beide methoden zo gekozen, dat na incubatie vrij liggende kolonies verwacht konden worden.

Hoofdstuk IV

TOXICITEIT EN LYSOGENITEIT BIJ C. DIPHTHERIAE. EXPERIMENTEN

Het doel van de door ons verrichte experimenten was om een beter inzicht te verkrijgen in de verhouding atoxische C. diphtheriae-bacteriophaag-toxische C. diphtheriae, zowel in vivo als in vitro. Wij hebben getracht deze doelstelling te verwezenlijken door enige aspecten van het probleem aan een onderzoek te onderwerpen.

Wij moeten vooropstellen, dat wij er niet in zijn geslaagd een beeld te krijgen van bovengenoemde verhouding in vivo. Het epidemiologisch aspect, waar Hewitt (1952) op gewezen heeft, is dus niet tot klaarheid gebracht. De opzet en resultaten van deze proeven zijn beschreven onder B, nadat onder A in het kort zal zijn uiteengezet hoe wij de eerste proeven van Freeman (1951), waarmee de mogelijkheid van conversie werd aangetoond, hebben kunnen reproduceren.

Ten einde te kunnen nagaan of meer phagen tot conversie in staat zijn, hebben wij getracht een aantal phagen te isoleren uit de beschikbare diphtheriestammen (C).

De resultaten van de bepalingen van de toxiciteit en de lysogeniteit van de tegen deze phagen resistente, oorspronkelijk atoxische stammen, zijn onder D vermeld.

Groman en Eaton (1955) hebben reeds geprobeerd een antwoord te geven op de vraag in hoeverre het vermogen van een phaag om conversie te bewerkstelligen phaagspecifiek is, d.w.z. de eigenschap is van één bepaalde phaag en onafhankelijk van een aantoonbare antigene verwantschap met andere phagen. Naar aanleiding van de resultaten van kruisneutralisatieproeven met twee phagen, waarvan één (β) tot conversie in staat was, beantwoordden deze auteurs bovenstaande vraag bevestigend.

Door middel van kruisneutralisatieproeven met een zestal phagen en antisera tegen vijf hiervan hebben wij ook een indruk willen krijgen omtrent de phaagspecificiteit van de converterende eigenschap. Parallel werden kruisresistentiebepalingen verricht met deze phagen en de hiermee lysogeen gemaakte stammen, daar ook hierdoor een beeld kan worden verkregen omtrent de eventuele verwantschap tussen phagen. De resultaten van deze proeven en de conclusies, die wij hieraan hebben verbonden, zijn onder E beschreven.

Voor de reeds in de Inleiding genoemde hypothese, die onder meer inhoudt, dat alle toxische diphtheriestammen lysogeen zijn, hebben wij ge-

poogd steun te vinden door de bactericide werking van U.V. bestraling op lysogene en niet-lysogene diphtherieculturen te vergelijken met de invloed van U.V. bestraling op toxische en atoxische stammen, waarvan niet bekend was of deze lysogeen waren (F).

Voor deze hypothese, volgens welke de toxiciteit van diphtheriestammen afhankelijk is van de lysogene eigenschap, hebben wij verder bewijzen proberen te vinden door op verschillende manieren te trachten niet-lysogene, atoxische diphtheriestammen te verkrijgen uit toxische stammen, om vervolgens de mogelijkheid van conversie van deze atoxische stammen tot de oorspronkelijke toxische stammen na te gaan (G).

A. *Reproductie van de proeven, waarmee conversie werd aangetoond*

Zoals reeds in Hoofdstuk III: E vermeld werd, slaagden wij er in de toxische C4 (β) stam te isoleren op een H.I.B. agarplaat of uit H.I.B., waarin de atoxische stam C4 en phaag β geënt waren. In den beginne pasten bij FREEMAN's techniek (1951) toe, waarbij de op een plaat ontstane kolonies van tegen phaag β resistente bacteriën afgeënt werden, waarna een toxiciteitsbepaling volgde.

Hoewel het percentage atoxische, tegen phaag β resistente, niet-lysogene bacteriën zeker geen 95 bedroeg (vgl. BARKSDALE en PAPPENHEIMER, 1954), moesten wij toch ook ervaren, dat men bij toepassing van deze techniek de kans heeft een tegen phaag β resistente kloon van de stam C4 te isoleren. Werden de stam en phaag β in H.I.B. geënt, dan konden wij na incubatie geen atoxische, resistente bacteriën aantonen. De mogelijkheid kon echter niet worden uitgesloten, dat er zich in de na overenting op een plaat gevormde kolonies een mengsel bevond van atoxische, niet-lysogene en toxische, lysogene, tegen phaag β resistente bacteriën. Wel gaven de toxiciteitsbepalingen van deze kolonies alle positieve resultaten.

In een later stadium van het onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van de inmiddels door passage van phaag β op C4 verkregen virulente phaag B, dit in navolging van BARKSDALE en PAPPENHEIMER. Door deze phaag te enten in een bouilloncultuur van tegen phaag β resistente C4 bacteriën werd ook een cultuur verkregen, waarvan alle bacteriën, na overenting op de plaat (zie blz. 40) en toxiciteitsbepaling van de hierop gevormde kolonies, toxisch bleken.

Uit het bovenstaande blijkt, dat het aantonen van het conversiephenomeen als zodanig geen moeilijkheden behoeft op te leveren. De resultaten van de proeven van GROMAN (1953a), die wezen op een selectief nadeel van de atoxische, resistente t.o.v. de toxische, lysogene bacteriën (zie ook blz. 49), en ook die van onze experimenten (zie tevens Hoofdstuk III: E) hebben o.i. duidelijk gemaakt, dat, indien er zich nog atoxische bacteriën in de tegen phaag β resistente cultuur bevinden, deze na passage van de

cultuur, geen belemmering vormen voor het aantonen van de toxiciteit hiervan.

Er zijn door ons geen proeven verricht met het doel aan te tonen, dat de conversie berust op een direct door de phaag veroorzaakte mutatie en niet op de selectie van een mutant. Wij menen, dat de resultaten van de vele proeven, die hiertoe gedaan zijn (zie blz. 18 e.v.), een voldoende bewijs vormen voor een direct verband tussen lysogeniteit en toxiciteit bij de stam C4 (β).

B. *Onderzoek naar het voorkomen van atoxische diphtheriebacteriën bij lijders aan diphtherie*

De betekenis van atoxische diphtheriebacteriën voor de epidemiologie van diphtherie is al gedurende enige decennia het onderwerp van vele studies geweest (zie Hoofdstuk II). Wij willen hier alleen de publicatie van Frobisher, Parsons en Updyke (1947) noemen, welke een voortreffelijk overzicht geeft van het werk, dat tot dien gedaan is om het belang van het vóórkomen van atoxische diphtheriebacteriën bij patiënten of dragers aan te tonen.

Sinds bekend is geworden, dat een bacteriophaag een atoxische stam in vitro kan converteren tot een toxische lijkt de mogelijkheid dat dit gebeuren ook in vivo plaatsvindt, een verklaring te kunnen geven voor het frequente vóórkomen van atoxische diphtheriebacteriën (Barksdale en Pappenheimer, 1954) tijdens een epidemie. Conversie in vivo kan dit echter alleen verklaren, als men aanneemt, dat bij een epidemie de toename van het aantal dragers van atoxische bacteriën primair is. De reeds genoemde waarneming van Parsons en Frobisher (1951), dat twee atoxische stammen, geïsoleerd bij reconvalescenten, wel door een phaag tot toxische geconverteerd konden worden, en dat dit niet mogelijk was met atoxische stammen, geïsoleerd bij dragers, is in dit verband ongetwijfeld van belang.

Hewitt (1952) zag in de bacteriophaag een agens, dat verantwoordelijk kan zijn voor de variaties in type en virulentie, die bij C. diphtheriae zijn waargenomen. Aldus zou verklaard kunnen worden, dat een drager van een blijkbaar onschuldig organisme de bron en verspreider van de ziekte kan worden, indien een phaag aanwezig is. Ons kwam deze hypothese als zeer aantrekkelijk voor. Om de juistheid er van aan te tonen is het echter zeker niet voldoende, dat vastgesteld wordt, dat in de natuur frequent diphtheriephagen voorkomen. Onderzoekingen op grote schaal zijn wat dit betreft nog niet gedaan, doch de lysogeniteit van vele door verscheidene onderzoekers geïsoleerde diphtheriestammen staat wel vast. Ook het voorkomen van atoxische stammen in verband met gevallen van diphtherie zal bewezen moeten worden, terwijl dan tevens deze atoxische stammen door gelijktijdig aanwezige phagen tot toxische geconverteerd moeten kunnen worden.

Wij meenden aan deze voorwaarden te kunnen voldoen door te trachten atoxische stammen te isoleren uit patiënten, lijdende aan diphtherie (waaruit al een toxische stam geïsoleerd was) en wel in een zo vroeg mogelijk stadium van de ziekte. Indien de hypothese juist is zal dan de kans het grootst zijn, dat nog niet geconverteerde, atoxische bacteriën aanwezig zijn in de kelen van deze patiënten. Van eventueel geïsoleerde atoxische stammen zou vervolgens moeten worden vastgesteld of deze tot toxische geconverteerd kunnen worden door een phaag, die vrijgemaakt zou moeten worden uit de gelijk geïsoleerde (lysogene) toxische stam.

Tijdens een epidemie zullen de meeste gevallen van diphtherie zeker veroorzaakt worden door infectie met toxische bacteriën, afkomstig van patiënten of dragers. Bij geïsoleerd voorkomende gevallen van diphtherie is deze verklaring niet de enig mogelijke. Het kwam ons voor dat het onderzoeken van keeluitstrijken van juist deze gevallen de meeste kans zou bieden om bewijzen te vinden voor bovengenoemde hypothese.

Wij hebben daarom de eerste keeluitstrijken van een aantal diphtheriepatiënten, die op één uitzondering na, allen als geïsoleerd voorkomende gevallen konden worden beschouwd, onderzocht op de aanwezigheid van atoxische diphtheriebacteriën naast de toxische (Tabel 2).

Tabel 2

nr. 10 (11)	nr. 17 (30)	nr. 31 (20)	nr. 49 (20)	nr. 59 (15)
11 (24)	18 (24)	38 (12)	52 (16)	60 (4)
13 (24)	22 (24)	39 (12)	53 (20)	
14 (23)	25 (15)	40 (9)	55 (18)	
15 (23)	26 (24)	44 (20)	57 (20)	
16 (24)	30 (20)	47 (24)	58 (20)	

Diphtheriestammen, geïsoleerd uit keeluitstrijken, die onderzocht werden op atoxische diphtheriebacteriën (Aantal op toxiciteit onderzochte kolonies).

Hiertoe werd een aantal kolonies, dat op de Claubergplaat gegroeid was, op toxiciteit onderzocht. Niet op elke plaat, waarop de keelwat van een patiënt was uitgestreken, had zich een groot aantal kolonies gevormd.

Het aantal per plaat onderzochte kolonies varieerde daardoor van 4 tot 30, gemideld waren dit er 19 per plaat. Het materiaal van 26 patiënten, uit de kelen van wie toxische diphtheriebacteriën waren geïsoleerd in de Streeklaboratoria voor de Volksgezondheid te Heerlen en Rotterdam, werd nagekeken op atoxische diphtheriebacteriën. De in totaal 495 onderzochte kolonies bleken echter alle te bestaan uit toxische diphtheriebacteriën.

Deze methode van onderzoek heeft ons dus geen gegevens kunnen verschaffen, die een beter begrip van de epidemiologische betekenis van atoxische diphtheriebacteriën mogelijk maken.

Naar aanleiding van een mededeling in de literatuur (PARSONS en FROBISHER, 1951) omtrent het vóórkomen van atoxische diphtheriebacteriën bij reconvalescenten, werd bij enkele van de in de beginphase van de ziekte onderzochte patiënten 3—4 weken later het onderzoek op atoxische bacteriën herhaald, ook zonder resultaat (SCHÖNFELD, 1958).

Het zoeken naar de aanwezigheid van atoxische diphtheriebacteriën in keeluitstrijken hebben wij om practische redenen niet kunnen uitbreiden tot contacten van patiënten. Misschien is een dergelijk onderzoek, op ruime schaal uitgevoerd, beter in staat gegevens te verschaffen, die ons een inzicht kunnen geven in de epidemiologische facetten van het conversiephenomeen.

C. *Phaagisolatie*

Om de eigenschappen (converterend vermogen, antigene eigenschappen, infectiespectrum) van andere phagen te kunnen vergelijken met die van phaag β, hebben wij getracht een aantal phagen te isoleren uit de ons beschikbare stammen van C. diphtheriae.

Voor de isolatie van deze phagen hebben wij gebruik gemaakt van de in Hoofdstuk III: B beschreven technieken. Eerst pasten wij de methode volgens HEWITT toe, later gingen wij over tot die van THIBAUT en FRÉDERICQ. Zonder passages bleek de laatstgenoemde methode betere kansen te geven dan die volgens HEWITT, om de lysogeniteit van een stam aan te tonen. De titers van de phaagfiltraten waren dan ook hoger. Werd het materiaal wel enige malen gepasseerd op de indicatorstam dan waren de resultaten van beide methoden gelijk. Bij de naamgeving van de phagen volgden wij de nomenclatuur van FAHEY (1952): Phaag 11/1 werd geisoleerd uit stam 11 en kan stam 1 lyseren. In Tabel 3 zijn de resultaten verkregen met de methode van HEWITT en die van THIBAUT en FRÉDERICQ, met en zonder passage van het te onderzoeken materiaal, vermeld.

TABEL 3

	Methode van HEWITT	Methode van THIBAUT en FRÉDERICQ
zonder passage	β	β, 39/1
met passage	β, 11/1, 13/1, 16/1, 22/1, 39/1	β, 11/1, 13/1, 16/1, 22/1, 39/1

Isolatie van phagen volgens de methode van HEWITT en die van THIBAUT en FRÉDERICQ, zonder en met passage van het te onderzoeken materiaal

Om het aantal bepalingen enigszins te beperken, hebben wij alleen de atoxische stammen als indicatorstam gebruikt. Een voor een phaag gevoelige toxische stam zou ons geen gegevens hebben kunnen verschaffen

omtrent een eventueel bij de phaag aanwezig vermogen tot conversie. Wel hebben wij, naar aanleiding van de mededelingen van PARSONS (1955) en GROMAN (1956) omtrent conversie door phagen, vrijgemaakt uit atoxische stammen, ook de meeste van de beschikbare atoxische stammen op lysogeniteit onderzocht. In Tabel 4 hebben wij een overzicht gegeven van de op lysogeniteit onderzochte- en indicatorstammen.

TABEL 4

a	nr.'s 1, **2**, 5, 6, 7, 8, 9, 10, **11**, 12, **13**, 14, 15, **16**, 17, 18, 21, **22**, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37, 38, **39**, 40, 41, 43, 47, 51
b	nr.'s 52, 53, 55, 57, 58, 59, 60
c	nr.'s 1, 23, 27, 29, 32, 43

De onder a vermelde stammen werden alle op lysogeniteit onderzocht met behulp van de onder c genoemde stammen als indicatorstammen; de onder b genoemde stammen werden alleen op lysogeniteit getest met stam 1 (C4) als indicatorstam

Van 6 stammen kon de lysogeniteit worden aangetoond, nl. de nr.'s 2 (C4 (β)), 11, 13, 16, 22 en 39. Deze stammen bleken lysogeen te zijn door phagen (2/1 (= β), 11/1, 13/1, 16/1, 22/1 en 39/1), die in staat waren de stammen 1 (C4) en 27 te lyseren. De phagen konden bij herhaling geïsoleerd worden. De gevoeligheidspatronen, voor de geïsoleerde phagen, van de stammen C4 en 27 waren dus identiek. Onder D zal hier dieper op worden ingegaan.

Phaagfiltraten, met titers van 10^4 of hoger, bleken niet in staat bij de atoxische stammen, die nog niet voor deze phagen gevoelig waren gebleken (nr.'s 23, 29, 32, 43, 61, 62), lysis te veroorzaken.

Mitisstammen (C4 en 27) (vgl. Tabel 1) kunnen dus gevoelig zijn voor phagen, afkomstig uit lysogene gravisstammen (nr.'s 11, 13, 16, 22 en 39). HEWITT (1952) wist een phaag, geïsoleerd uit een lysogene gravisstam, aan stammen van een ander type te adapteren. Het infectiespectrum van deze geadapteerde phagen bleek dan beperkt tot één serologisch type. Hierin kan de verklaring liggen van de ongevoeligheid van de andere mitisstammen voor de door ons geïsoleerde phagen.

Het aantal stammen, waarvan de lysogeniteit kon worden vastgesteld (6), is betrekkelijk klein in verhouding tot het aantal op lysogeniteit onderzochte stammen (42). De getallen van TOSHACH (1950) nl. 8 van de 135, en van THIBAUT en FRÉDERICQ (1952) nl. 10 van de 128, zijn hiermee echter wel te vergelijken. HEWITT (1952) daarentegen, vond 5 lysogene onder 8 willekeurige stammen van C. diphtheriae. Het door ons gevonden lage percentage kan gedeeltelijk te wijten zijn aan het feit, dat wij alleen de atoxische stammen als indicatorstammen gebruikten.

Opmerkelijk is, dat de 10 lysogene stammen van THIBAUT en FRÉDERICQ alle tot de groep van 64 onderzochte gravisstammen behoorden en

er zich onder de 64 mitisstammen geen aantoonbaar lysogene stam bevond. Daar wij slechts over 2 toxische en 6 atoxische mitisstammen beschikten, zijn onze cijfers (1 van de 8 stammen bleek lysogeen) hiermee moeilijk te vergelijken; bovendien was de lysogeniteit van deze ene mitisstam reeds bekend: C4 (β).

De hierboven beschreven bevindingen behoeven niet in tegenspraak te zijn met de hypothese, dat de toxiciteit van een stam van C. diphtheriae afhankelijk is van de lysogeniteit van deze stam. Het aantonen van de lysogeniteit van een stam is immers afhankelijk van een phaaggevoelige stam, zodat bij ontbreken hiervan de lysogeniteit niet vastgesteld zal kunnen worden.

Het onderzoek van de geïsoleerde phagen zal in de volgende paragrafen besproken worden.

D. *Lysogeniteit en toxiciteit van phaagresistente stammen*

Voor de bereiding van lysogene stammen werd gebruik gemaakt van de in Hoofdstuk III: E beschreven methoden. Het eenvoudigst bleek de methode, waarbij phaagfiltraat en bacteriën in H.I.B. werden geënt; na incubatie werd dan de resistente groei overgeënt en opgekweekt.

De lysogeniteit van de aldus verkregen phaagresistente culturen C4 (β), C4R11/1, C4R13/1, C4R16/1, C4R22/1 en C4R39/1 (R = resistent tegen) werd aangetoond met behulp van de inducerende werking van U.V. bestraling (zie blz. 35). Phaagtitraties van de filtraten, verkregen uit de resistente culturen, die wel en niet met U.V. bestraald waren, gaven de resultaten, die in Tabel 5 zijn vermeld.

Tabel 5

Filtraat (U.V.)	Titer	Filtraat (zonder U.V.)	Titer
C4Rβ	$> 10^5$	C4Rβ	10^3
C4R11/1	$1.4 .10^2$	C4R11/1	—
C4R13/1	6 .10	C4R13/1	—
C4R16/1	$> 10^5$	C4R16/1	—
C4R22/1	$8.3 .10^2$	C4R22/1	—
C4R39/1	$> 3 .10^3$	C4R39/1	$1.2.10^2$

Titers van phaagfiltraten, bereid uit culturen van phaagresistente (lysogene) stammen, na U.V. bestraling, en idem zonder U.V. bestraling

Hiermee is de lysogeniteit van de cultuur als geheel o.i. bewezen. De aanwezigheid van niet-lysogene, phaagresistente bacteriën in deze culturen kon echter niet uitgesloten worden (vgl. blz. 35 en 43). Alleen culturen met één cel als uitgangspunt zouden hieromtrent opheldering hebben kunnen verschaffen. Daar wij niet over een micromanipulator beschikten was deze isolatietechniek niet uitvoerbaar.

Het is aannemelijk, dat ook in deze phaagresistente culturen de niet-lysogene, resistente bacteriën een selectief nadeel hadden ten opzichte van de lysogene, zoals GROMAN (1953a) vaststelde voor de tegen phaag β resistente cultuur van de stam C4. De waarnemingen, die WAHL (1953) deed betreffende tegen een phaag semiresistente bacterieculturen (d.w.z. culturen, waarin phaagresistente en phaaggevoelige, doch overigens identieke bacteriën voorkomen) kunnen een dergelijk selectief nadeel misschien verklaren. In de progenituur van primair phaagresistente bacteriën in een semiresistente cultuur bleken namelijk weer phaaggevoelige bacteriën voor te komen. Daar deze laatste, indien het een gematigde phaag betreft, ook lysogeen kunnen worden, zullen na enige generaties de lysogene bacteriën de resistente, niet-lysogene verdrongen kunnen hebben.

De toxiciteitsbepalingen van de lysogene culturen vielen, uitgezonderd die van de C4Rβ en 27Rβ culturen, alle negatief uit.

De phaaggevoeligheidspatronen van de stammen C4 en 27 waren dus identiek, alleen phaag β was in staat beide stammen tot toxiciteit te converteren. Wij hebben de onderzoekingen wat stam 27 betreft niet voortgezet, omdat juist de verschillen in reactie op een aantal phagen de kenmerkende eigenschappen van bacteriële stammen en phagen duidelijk moeten maken. Serologische typering, die misschien uitsluitsel zal kunnen geven omtrent een eventuele indentiteit van beide stammen, hebben wij niet verricht. Indien uit een dergelijke typering een voor deze stammen gelijke antigene structuur zou blijken, zullen wij contaminatie zelfs niet mogen uitsluiten.

Alleen van phaag β was dus een converterend vermogen aantoonbaar. Of dit vermogen in verband gebracht kan worden met de antigene eigenschappen en het infectiespectrum in kruisresistentieproeven, zal onder E worden uiteengezet.

E. *Experimenten ter vaststelling van een eventuele verwantschap tussen geïsoleerde phagen*

ASHESHOV c.s. (1933) heeft er reeds op gewezen, dat de plaquemorphologie geen betrouwbare eigenschap is om phagen te differentiëren. Bij passage kunnen wijzigingen in het aspect van de gevormde plaques optreden, die veroorzaakt kunnen worden door mutatie van de phagen. Bovendien kunnen de phagen uit één suspensie plaques van verschillende grootte geven (Plaat 6). Dat het hier geen mengsel van twee phagen betrof, kon vastgesteld worden door driemaal een superisolatie van de kleine plaques te verrichten, waarna nog steeds plaques van sterk uiteenlopende diameter werden gevormd.

1. Kruisneutralisatieproeven

Met behulp van kruisneutralisatieproeven kan echter een eventueel aan-

wezige verwantschap tussen phagen aangetoond worden (HERSHEY, KALMANSON en BRONFENBRENNER, 1943; DELBRÜCK, 1946; ADAMS, 1950).

Wij maakten in deze proeven gebruik van de virulente mutanten van de geïsoleerde phagen. Alleen hiermee konden voldoende hoge titers bereikt worden om konijnen te immuniseren. De voor de proeven zelf benodigde phaagtiters (10^6—10^7) waren soms ook niet bereikbaar met gematigde phagen; een hoog lysogenisatiepercentage kan hier de oorzaak van zijn geweest.

Dat virulente mutanten en mutanten met een gewijzigd infectiespectrum serologisch niet te onderscheiden zijn van gematigde phagen, blijkt uit de gegevens die BURNET en LUSH (1936), ADAMS (1950) en BERTANI (1958) verschaften.

Door een aantal passages van de phagen in H.I.B. te verrichten konden gemakkelijk de virulente mutanten verkregen worden (vgl. GROMAN en EATON, 1955). Antiphaagsera werden bereid volgens de in Hoofdstuk III: F beschreven methode. De neutralisatieproeven werden gedaan volgens het op blz. 37 weergegeven protocol. In Tabel 6 willen wij enige voorbeelden van neutralisatieproeven laten zien. Het betreft hier de bepaling van de neutralisatie-indices (K) (zie blz. 37) van serum nr. 332 (anti phaag 22/1) ten opzichte van de beschikbare phagen.

TABEL 6

Phaagfiltraat	Begin-verdunning	Eind-verdunning	Verdunning serum anti phaag 22/1 (332)	Neutralisatietijd min.	Aantal plaques	Neutralisatie %	K-waarde
22/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/10	15	9	92.0	1.67
22/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/10	15	9	92.0	1.67
22/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	—	—	113	——	——
22/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/5	30	300	38.8	—
22/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/5	30	225	54.1	—
22/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	—	—	490	——	——
11/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/5	30	32	75.6	—
11/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/5	30	18	86.2	—
11/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	—	—	131	——	——
13/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/5	30	950	2.6	—
13/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	1/5	30	900	7.7	—
13/1 (dd 27/11)	10^{-1}	10^{-4}	—	—	975	——	——
16/1 (dd 27/11)	10^{-2}	10^{-5}	1/10	15	53	90.7	1.55
16/1 (dd 27/11)	10^{-2}	10^{-5}	1/10	15	40	92.8	1.73
16/1 (dd 27/11)	10^{-2}	10^{-5}	—	—	560	——	——
39/1 (dd 27/11)	10^{-2}	10^{-5}	1/10	15	28	91.0	1.58
39/1 (dd 27/11)	10^{-2}	10^{-5}	1/10	15	34	89.0	—
39/1 (dd 27/11)	10^{-2}	10^{-5}	—	—	310	——	——

Neutralisatieproeven met serum 332 (anti phaag 22/1) en de geïsoleerde phagen volgens het op blz. 37 weergegeven protocol

Uit de bepalingen bleek, dat, ook indien wij ons hielden aan de voorwaarde van minimaal 90% en maximaal 99% neutralisatie om de vergelijking, waaruit de K-waarde wordt berekend, geldig te doen zijn (ADAMS, 1950), er nog variaties in K-waarden optraden. Dat experimentele fouten hier niet de oorzaak van zijn wordt duidelijk door de in verhouding hiermee geringe verschillen in de uitkomsten van twee gelijke bepalingen. Ook verschillen in titer van de gebruikte phaagfiltraten van 10^6—10^7 (onvermijdelijk in verband met het feit, dat de titers van bij 4° C bewaarde filtraten niet constant blijven) bleken de genoemde variaties niet te kunnen verklaren. Berekening van de K-waarden uit de resultaten van proeven, waarin een hogere serumverdunning was gebruikt of waarin de neutralisatietijd korter was, leverde hogere waarden op. In Tabel 7, waarin alle resultaten vermeld staan, komt dit tot uiting.

Om vergelijkbare uitkomsten te krijgen zou het dus wenselijk lijken om de K-waarden te berekenen uit neutralisatieproeven, waarin de serumverdunning en de neutralisatietijd constant worden gehouden. Indien wij ons echter willen houden aan de voorwaarde van minimaal 90% en maximaal 99% neutralisatie, dan is dit slechts in die gevallen mogelijk, waarin de K-waarden van een serum ten opzichte van alle geteste phagen weinig uiteenlopen. Daar dit bij geen van onze antiphaagsera het geval was, waren wij gedwongen de K-waarden te berekenen uit de resultaten van neutralisatieproeven, waarin serumverdunningen en neutralisatietijden verschilden.

Wij hebben die K-waarden als representatief beschouwd, welke resulteerden uit neutralisatieproeven, waarin gebruik was gemaakt van een maximale serumverdunning en een minimale neutralisatietijd en waarbij tenminste 90% neutralisatie optrad. Gezien het stijgen van de K-waarde met toenemende serumverdunning en afnemende neutralisatietijd zijn dit de hoogste gevonden K-waarden bij een neutralisatiepercentage van tenminste 90%.

De serumverdunning was 1/5 of 1/10, de neutralisatietijd 30, 15 of 5 minuten.

Gemiddelde waarden, berekend uit alle neutralisatie-indices, vastgesteld voor een antiphaagserum ten opzichte van één phaag, zouden afhankelijk zijn geweest van het aantal bepalingen verricht voor één neutralisatietijd en één serumverdunning, en ook van het aantal bepalingen, dat, bij variatie in deze twee factoren, mogelijk is zonder de grens van 90% neutralisatie te overschrijden.

Wij menen dat de aldus bepaalde neutralisatie-indices het beste een beeld kunnen geven van antigene verschillen en overeenkomsten tussen de ons beschikbare phagen. In Tabel 8 zijn de op de boven beschreven wijze vastgestelde K-waarden weergegeven.

Deze resultaten zullen tezamen met de uitkomsten van de kruisresistentieproeven op blz. 54 e.v. besproken worden.

TABEL 7

serum / phaag	Anti B			Anti 39/1			Anti 16/1			Anti 22/1			Anti 11/1		
	neutr. tijd	verd. 1/5	verd. 1/10	neutr. tijd	verd. 1/5	verd. 1/10	neutr. tijd	verd. 1/5	verd. 1/10	neutr. tijd	verd. 1/5	verd. 1/10	neutr. tijd	verd. 1/5	verd. 1/10
B	5		8.18	30	0.48	—	30	—		30	—		30	—	
	5		7.49	30	0.52	—	30	—		30	—		30	—	
	5		7.49												
	5		6.62												
39/1	30	—		30	X	0.84	30	0.54	—	30	X	1.04	30	0.59	0.77
	30	—		30		1.32	30	0.47	—	30	X	1.04	30	0.67	0.86
				15		—				15		1.58			
										15		—			
16/1	30	—		30	0.50	—	30	X	1.13	30	X	1.19	30	0.59	0.74
	30	—		30	0.53	—	30		0.82	30	X	1.22	30	0.61	0.91
							15		—	15		1.55			
										15		1.73			
22/1	30	—		30	—		30	—		30		1.03 0.97	30	0.65	0.81
	30	—		30	—		30	—		30		1.23 1.24 1.12	30	X	0.97
										15		1.67 1.67			
										15		1.60 1.69			
11/1	30	—		30	—		30	—		30	—		30	0.42 0.47	0.76
	30	—		30	—		30	—		30	—		30	0.48 0.57	0.77 0.85
13/1	30	—		30	—		30	—		30	—		30	—	
	30	—		30	—		30	—		30	—		30	—	

K-waarden van antiphaagsera t.o.v. phagen, berekend uit de resultaten van kruisneutralisatieproeven, waarin maximaal 99%, minimaal 90 % neutralisatie optrad

— : < 90% neutralisatie (indien verd. 1/5, neutr.tijd 30 min. → K-waarde < 0.38)
X : > 99% neutralisatie

TABEL 8

phaag \ serum	anti B	anti 39/1	anti 16/1	anti 22/1	anti 11/1
B	**8.18**	0.48	—	—	—
	7.49				
	7.49	0.52	—	—	—
	6.62				
39/1	—	**0.84**	0.54	1.58	0.77
	—	**1.32**	0.47		0.86
16/1	—	0.50	**1.13**	1.55	0.74
	—	0.53	**0.82**	1.73	0.91
22/1	—	—	—	**1.67**	0.81
	—	—	—	**1.67**	
				1.60	0.97
				1.69	
11/1	—	—	—	—	**0.77**
	—	—	—	—	**0.76**
					0.85
13/1	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—

K-waarden van antiphaagsera t.o.v. phagen; resultaten van bepalingen met maximale verdunning en minimale neutralisatietijd, waarbij tenminste 90% neutralisatie optrad
— : $K < 0.38$

2. Kruisresistentieproeven

Lysogene bacteriën zijn immuun voor de werkzaamheid van de homologe (gematigde) phaag (BAIL, 1925; BURNET en LUSH, 1936). De specificiteit van deze immuniteit kan met behulp van kruisimmuniteitsproeven bepaald worden (BERTANI, 1958). Lysogene bacteriën blijken ook immuun te zijn voor de gematigde mutanten van de homologe phaag. Virulente mutanten zijn soms in staat de lysogene bacterie te lyseren (LWOFF, 1953; BERTANI, 1958), vgl. de virulente phaag Bh, die stam C4 (β) kan lyseren (GROMAN, 1955).

De immuniteit bestaat niet altijd voor alle phagen, die serologisch verwant zijn met de homologe phaag (BERTANI, 1958; BOYD, 1956a). Hieruit zou men kunnen concluderen, dat door middel van kruisimmuniteitsproeven een indeling van phagen te maken is, die nog verder gaat dan de serologische.

Er zijn aanwijzingen, dat de immuniteit berust op een physiologisch mechanisme en dat de immunologische eigenschappen grotendeels onafhankelijk zijn van de chromosomale localisatie van de prophaag. Juist de chromosomale aanhechtingsplaats van de prophaag zou specifiek zijn voor homologe phagen (BERTANI, 1958).

Uit het bovenstaande moge duidelijk worden, dat weliswaar verschillende kenmerkende eigenschappen van de immuniteit bekend zijn, doch dat het wezen er van nog niet doorgrond is. De waarde van kruisimmuniteitsproeven voor de indeling van phagen kan daarom alleen liggen in de karakteristieke eigenschappen van de immuniteit van een lysogene bacterie. Ofschoon DELBRÜCK (1946) weinig waarde hechtte aan deze proeven om bacteriophagen te kunnen indelen, vermeldde hij de resultaten van kruisresistentieproeven met de T-phagen van E. coli, en kwam tot de slotsom, dat deze vergelijkbaar zijn met die, verkregen door middel van kruisneutralisatieproeven. Het leek ons daarom nuttig deze proeven ook te verrichten. Hoewel niets bekend is omtrent de aard van een uit kruisimmuniteit gebleken verwantschap tussen twee phagen, zekere aanwijzingen betreffende een overeenkomst met de antigene kenmerken zullen deze proeven ons misschien toch kunnen geven.

De lysogene resistente stammen werden bereid volgens de in Hoofdstuk III: E beschreven methode. De phaaggevoeligheid van deze stammen werd bepaald met de methode van GRATIA. In deze proeven werd alleen gewerkt met gematigde phagen.

In Tabel 9 zijn de resultaten van de kruisresistentieproeven vermeld.

TABEL 9

stam / phaag	C4Rβ	C4R39/1	C4R16/1	C4R22/1	C4R11/1	C4R13/1
β	—	—	+	+	+	+
39/1	+	—	—	—	—	—
16/1	+	—	—	—	—	—
22/1	+	—	—	—	—	—
11/1	+	—	—	—	—	—
13/1	+	—	—	—	—	—

Kruisimmuniteit van lysogene stammen en hun phagen

\+ : lysis
— : geen lysis

Bezien wij de resultaten van de kruisneutralisatie- en de kruisimmuniteitsproeven dan kunnen wij een zekere overeenkomst vaststellen.

De phagen respectievelijk antiphaagsera in de serologische experimenten staan in volgorde van verwantschap in de tabellen 7 en 8. Antiphaag 39/1-serum is het enige dat in staat is in geringe mate phaag B te neutraliseren. Phaag 39/1 wordt niet geremd door anti-B-serum. Stam C4Rβ (Tabel 9) is niet immuun voor phaag 39/1, stam C4R39/1 is wel immuun voor phaag β. Een zekere, zij het geringe, verwantschap tussen beide phagen lijkt er dus te bestaan. De overige phagen tonen geen overeenkom-

sten met phaag B. De phagen 39/1, 16/1, 22/1 en 11/1 lijken alle min of meer verwant te zijn.

Het gemeenschappelijk bezit van bepaalde antigenen kan de gelijke of ongeveer gelijke K-waarden verklaren. Het ontbreken van andere antigenen bij één phaag kan de oorzaak zijn van de verschillen in K-waarden, die aan de dag treden bij de gekruiste proef.

De kruisimmuniteitsproeven tonen, behalve die met phaag 13/1 en stam C4R13/1, een zelfde beeld als de neutralisatieproeven, nl. een zekere verwantschap tussen vier niet tot conversie in staat zijnde phagen, een geringe overeenkomst tussen phaag 39/1 en phaag β, en verschillen tussen phaag β en de overige phagen.

De indeling volgens de resultaten van de kruisimmuniteitsproeven is dus vrij goed in overeenstemming met de indeling naar antigene eigenschappen, zij het dat door de kruisneutralisatieproeven kleine verschillen tussen phagen duidelijk worden. Alleen phaag 13/1 geeft afwijkende resultaten.

Groman en Eaton (1955) konden geen antigene verschillen aantonen tussen phaag β en phaag γ, die niet tot conversie in staat is. Echter stam C4 (β) is wel gevoelig voor de lytische activiteit van phaag γ en kan ook dubbel lysogeen worden: C4 (β) (γ). De phagen β en γ zijn dus zeker niet identiek, nog geheel afgezien van het converterend vermogen van phaag β.

Onderzoek van een beperkt aantal phagen, waarvan slechts één tot conversie in staat is, laat geen definitieve conclusie toe omtrent het verband tussen antigene eigenschappen, immunologische kenmerken en converterend vermogen. Bovendien kan niet uitgesloten worden, dat het type van de lysogene stam, waaruit een phaag geïsoleerd werd, in verband staat met de antigene eigenschappen van deze phaag. Daar adaptatie van phagen aan diphtheriestammen van een ander type mogelijk is, deze stammen ook door deze phagen lysogeen kunnen worden en de antigene eigenschappen van een phaag door mutatie niet aantoonbaar beïnvloed worden (zie blz. 50), lijkt dit echter niet waarschijnlijk.

Wij zouden uit onze experimenten en uit die van Groman en Eaton de voorlopige conclusie willen trekken, dat het mogelijk is om, met behulp van kruisneutralisatie- en kruisresistentieproeven, aan te tonen, dat er antigene of immunologische verschillen bestaan tussen een phaag met converterend vermogen ten opzichte van een bepaalde stam en phagen, waarvan deze eigenschap niet vastgesteld kon worden. Ook overeenkomsten wat betreft antigene en immunologische eigenschappen kunnen voor phagen zonder converterend vermogen ten opzichte van een bepaalde phaaggevoelige stam aangetoond worden.

F. *Bactericide werking van U.V. bestraling op lysogene en niet-lysogene bacteriën*

Het ontbreken van een gevoelige stam zou de oorzaak kunnen zijn van het feit, dat de lysogeniteit van een stam niet aan te tonen is. Met deze

mogelijkheid voor ogen hebben wij de hypothese naar voren gebracht, dat alle toxische diphtheriestammen hun toxiciteit ontlenen aan de lysogeniteit van de bacteriën, veroorzaakt door phagen met een, misschien voor deze bacteriën specifiek, converterend vermogen.

Een andere verklaring voor het feit, dat vele toxische diphtheriestammen niet aantoonbaar lysogeen zijn, kan gegeven worden door aan te nemen dat de toxische stammen defectief lysogeen zijn. Immunologisch hebben defectief lysogene stammen dezelfde eigenschappen als lysogene, doch bij inductie maken deze stammen weinig of geen phagen vrij (BERTANI, 1953a). JACOB, FUERST en WOLLMAN (1957) stelden vast, dat defectief lysogene stammen van E.coli dezelfde gevoeligheid hebben voor de bactericide werking van U.V. bestraling als normale lysogene stammen.

De dosis U.V. bestraling, die nodig is om een bepaald percentage van een cultuur van niet-lysogene bacteriën te doden, is aanzienlijk groter dan die voor lysogene bacteriën (WEIGLE en DELBRÜCK, 1951). Wij meenden dit verschijnsel te kunnen gebruiken om de lysogeniteit van diphtheriestammen vast te stellen.

De enige stam, waarvan de lysogeniteit zeer onwaarschijnlijk geacht kon worden, was de stam C4. Het is namelijk zeer goed mogelijk, dat ook de lysogeniteit van atoxische stammen, die phagen dragen, welke niet in staat zijn deze stammen tot toxiciteit te converteren, niet aantoonbaar is. Volgens de in Hoofdstuk III: H beschreven methoden hebben wij de bactericide werking van U.V. bestraling nagegaan op een waarschijnlijk niet-lysogene stam (C4), enige stammen, waarvan de lysogeniteit vaststond (C4(β), 11 en 22) en een stam, waarvan dit niet bekend was (49).

Met geen van beide methoden konden verschillen van betekenis in de U.V. gevoeligheid worden aangetoond tussen de stam C4 en de overige stammen. In Fig. 2 en Fig. 3 zijn de curven weergegeven, die de bactericide werking van U.V. bestraling op deze stammen illustreren. Deze resultaten kunnen verklaard worden òf door aan te nemen, dat stam C4 lysogeen is door een onbekende phaag, waarvoor geen gevoelige stam beschikbaar was, òf door aan te nemen dat stam C4 defectief lysogeen is, òf door het feit, dat het voor colistammen waargenomen verschijnsel, dat de U.V. gevoeligheid van lysogene stammen groter is dan van niet-lysogene, niet geldt voor diphtheriestammen.

Deze methode van onderzoek kan dus geen inlichtingen verschaffen omtrent het wel of niet aanwezig zijn van de lysogene eigenschap bij een stam van C. diphtheriae.

G. *Experimenten ten einde niet-lysogene uit lysogene stammen te isoleren*

Aangezien, indien onze hypothese juist is, het ontbreken van een gevoelige stam de oorzaak is van de onmogelijkheid om de lysogeniteit van toxische diphtheriestammen aan te tonen, hebben wij gezocht naar methoden, waarmee een niet-lysogene mutant verkregen zou kunnen worden uit een cultuur van lysogene, toxische bacteriën. Deze mutant, waaruit de

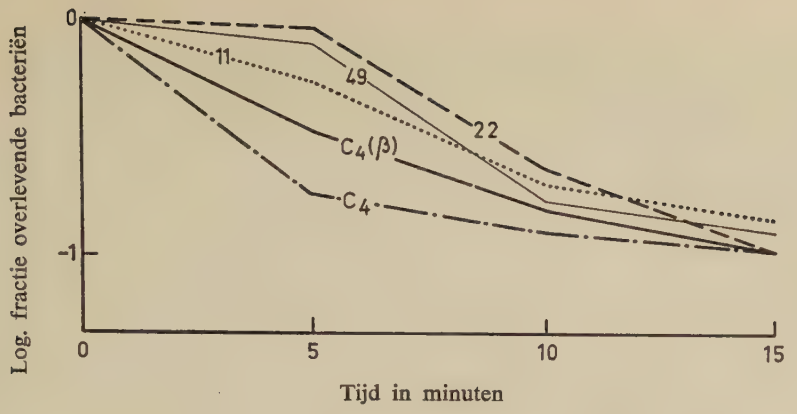


Fig. 2. U.V. bestraling van H.I.B. culturen

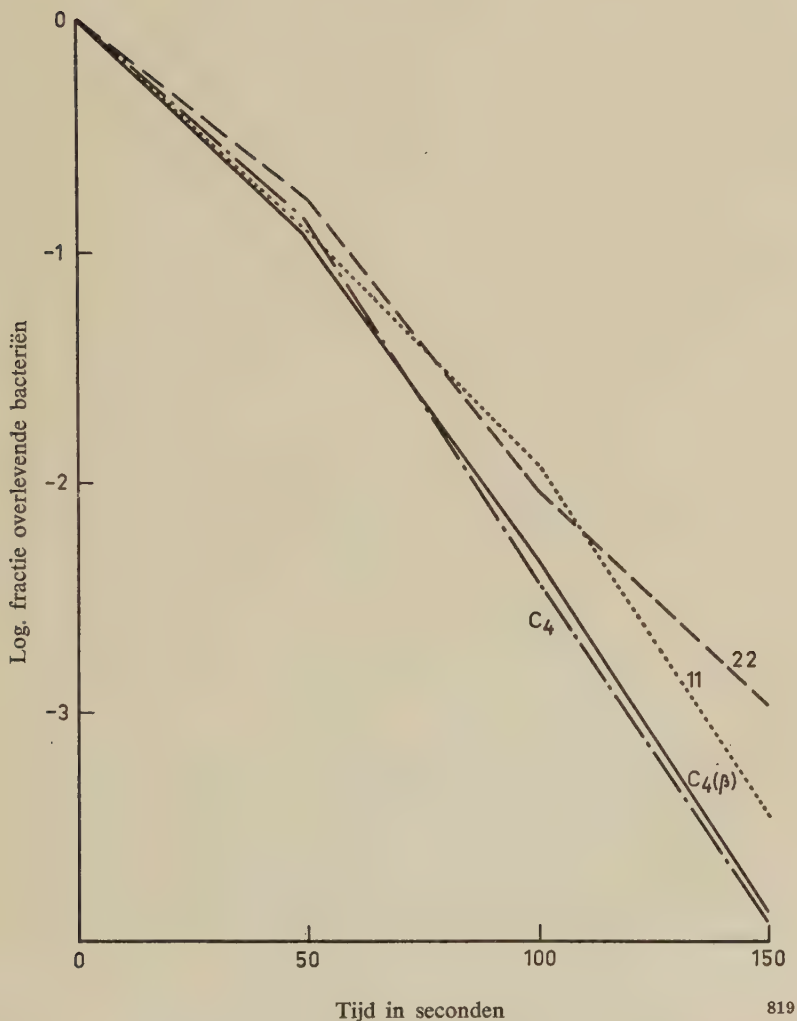


Fig. 3. U.V. bestraling van culturen op H.I.B.agar

phaag dus verwijderd is, zou dan atoxisch moeten zijn, gevoelig voor de betreffende phaag en door deze phaag te converteren tot de oorspronkelijke toxische stam.

GROMAN (1955) is er in geslaagd om, met behulp van een techniek, die BERTANI (1953) voor het eerst beschreef voor Sh. dysenteriae, bacteriën uit een cultuur van de stam C4(β) te isoleren, die in alle opzichten identiek bleken met die van de stam C4. Een cultuur van de stam C4(β) werd blootgesteld aan de lytische werking van de phaag Bh (dit is de sterk virulente mutant van phaag β; ook C4(β) is gevoelig voor deze phaag). Enige van de resistente kolonies bleken te bestaan uit bacteriën van de stam C4. Het mechanisme van deze 'reversie' tot een atoxische en niet-lysogene bacterie is niet bekend.

Hoewel de isolatie van phaag Bh, door passage van phaag B op stam C4(β), betrekkelijk eenvoudig bleek, werd toch van deze methode afgezien, daar zij voor stammen, waarvan de lysogeniteit niet aangetoond was, onuitvoerbaar zou zijn bij gebrek aan de betreffende phaag. Voor de bekend lysogene en toxische stammen gold hetzelfde, daar zonder tussenkomst van een niet-lysogene bacteriële mutant, waarop de uit een dergelijke stam geïsoleerde phaag door passage grotere virulentie ten opzichte van deze stam zou moeten verkrijgen, niet beschikt zou kunnen worden over een sterk virulente phaagmutant.

Er werd daarom uitgezien naar een andere methode, die meer kans op succes zou bieden.

Dat in lysogene bacterieculturen ook niet-lysogene bacteriën kunnen voorkomen is bekend sinds DEN DOOREN DE JONG (1931) asporogene, niet-lysogene, phaaggevoelige mutanten wist te isoleren uit een cultuur van een lysogene B. megatherium.

Men neemt aan, dat in een lysogene cultuur zo nu en dan een cel kan overgaan in de niet-lysogene staat. Door readsorptie van in de cultuur aanwezige phagen, vrijgekomen door spontane lysis van lysogene bacteriën, zullen deze cellen gelyseerd worden of weer lysogeen worden. Aldus zal er een evenwicht ontstaan tussen lysogene en niet-lysogene, gevoelige bacteriën, afhankelijk van de mate, waarin reversie tot gevoeligheid voor de phaag optreedt en de mate van reïnfectie (BERTANI, 1958).

BERTANI gaf een overzicht van de onderzoekingen, die verricht zijn met het doel niet-lysogene, phaaggevoelige bacteriën te verkrijgen uit een lysogene cultuur.

STOLP's methode (1957), berustend op het principe, dat de op een plaat door bacteriën uit een lysogene cultuur gevormde niet-lysogene kolonies tekenen van lysis zullen vertonen, indien de betreffende phaag door 'spraying' hierop geënt wordt, is alleen bruikbaar als het percentage niet-lysogene, gevoelige bacteriën in een dergelijke cultuur redelijk hoog is (1% of hoger) en men bovendien beschikt over een filtraat van deze phaag met een redelijk hoge titer.

Methoden, waarbij gebruik wordt gemaakt van de grotere gevoeligheid van lysogene bacteriën voor U.V. bestraling, leken ons, in verband met de onder F vermelde resultaten, niet geschikt om phaaggevoelige mutanten uit een lysogene cultuur van C. diphtheriae te isoleren.

De methode, die CLARKE (1952) en LWOFF (1953) toepasten bij B. megatherium berust op het feit, dat de aanwezigheid van Ca-ionen in het medium noodzakelijk is om de phagen in staat te stellen de bacteriën te lyseren. CLARKE toonde aan, dat Ca-ionen niet de adsorptie van de phaag aan B. megatherium beïnvloeden, doch waarschijnlijk nodig zijn om de penetratie van het virus in de cel mogelijk te maken. Uitgaande van de hypothese, dat in een medium, vrij van Ca-ionen, het genoemde evenwicht tussen lysogene en niet-lysogene, phaaggevoelige bacteriën verstoord wordt en de niet-lysogene bacteriën zich zonder gereïnfecteerd te worden kunnen vermeerderen, heeft CLARKE een lysogene stam van B. megatherium een groot aantal malen in een dergelijk medium gepasseerd, in de verwachting dat deze passages zouden resulteren in een daling van de phaagtiter van het cultuurfiltraat en de vorming van een cultuur, alleen bestaande uit niet-lysogene, phaaggevoelige bacteriën.

Door toevoegen van 3‰ Na-citraat werd een voor deze proef geschikt medium verkregen, daar eventueel aanwezige Ca-ionen door het citraat gebonden werden. Na 61 passages bestond de cultuur uitsluitend uit niet-lysogene, phaaggevoelige bacteriën, terwijl geen phaag meer aangetoond kon worden in het cultuurfiltraat.

LWOFF (1953) gebruikte een medium met oxaalzuur voor een soortgelijke proef. Na 24 passages van een andere lysogene megatheriumstam bleek deze phaaggevoelig en niet meer lysogeen. SVET-MOLDAVSKII (1956) wist een permanent atoxische variant van de diphtheriestam PW8 te verkrijgen door herhaalde passage van deze stam in een medium met Na-citraat. In het referaat over deze publicatie wordt echter niet over phaagadsorptieremming gesproken. BERTANI (1958) meende, dat het aantal passages van de megatheriumstammen van CLARKE en LWOFF te gering was om alléén een verklaring te kunnen geven voor de selectie van niet-lysogene bacteriën.

Met deze methode hebben wij getracht phaaggevoelige, niet-lysogene stammen van C. diphtheriae te isoleren uit lysogene, toxische stammen. Ook voor het optreden van lysis van een diphtheriebacterie door een phaag zijn namelijk Ca-ionen in het medium essentieel (BARKSDALE en PAPPENHEIMER, 1954). Het medium, waarin de stammen gepasseerd werden, bestond uit H.I.B. + 3‰ Na-citraat. Alvorens tot passage van de stammen over te gaan werd nagegaan of in dit medium de werking van phaag β op stam C4 geremd werd. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. De bacteriële groei werd niet beïnvloed door 3‰ Na-citraat in het medium.

Er werden dagelijkse passages verricht van een vijftiental toxische stam-

men, van sommige waarvan de lysogeniteit bekend was. Dit waren de stammen: C4(β), 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 25, 26 en 28. Na een aantal passages, variërend van 40 tot 75 (C4(β)) werden de H.I.B. citraatculturen op H.I.B. agarplaten uitgestreken, waarna toxiciteitsbepaling werd gedaan van 20 kolonies per stam (in dit stadium van het onderzoek beschikten wij nog niet over het P.P.S.A. medium). Deze bepalingen vielen alle positief uit. In de culturen van de bekend lysogene stammen waren, na overenting in H.I.B., vrije phagen aan te tonen. De methode van CLARKE bleek dus niet geschikt om niet-lysogene stammen te verkrijgen uit culturen van lysogene diphtheriestammen.

GROMAN en BOBB (1955) stelden vast, dat het niet-ionische detergens Tween 80 in concentraties van 0.1% of hoger de adsorptie van phaag B aan C4-bacteriën volledig remt. Het in geringe mate in Tween 80 voorkomende vrije oliezuur bleek niet verantwoordelijk te zijn voor deze werking.

Zij konden evenwel deze werking niet bij andere, niet alle met name genoemde (omtrent andere diphtheriebacterie-phaagsystemen wordt niets vermeld), bacterie-phaagsystemen aantonen.

Desalniettemin meenden wij, dat het de moeite waard zou zijn om Tween 80 als phaagadsorptieremmende stof toe te voegen aan een medium, waarin toxische stammen zouden moeten worden gepasseerd om te trachten niet-lysogene mutanten te verkrijgen. Daar de activiteit van Tween 80 berust op een modificatie van het bacterieoppervlak, die reversibel was gebleken, leek de kans, dat passage van lysogene bacteriën zou resulteren in een mogelijk niet-lysogene, maar ook phaagongevoelige stam, niet groot. Deze gedachtengang was aanleiding tot het verrichten van de hieronder beschreven proeven.

De remming van de adsorptie van phaag B aan C4-bacteriën door Tween 80 werd aangetoond door een bacterie-phaagmengsel (phaagconcentratie $\pm$ 10^7/cc) uit een medium, bestaande uit H.I.B. + 0.1% Tween 80 volgens de methode van GRATIA op een H.I.B. agarplaat te enten; na incubatie waren geen tekenen van lysis waar te nemen. Ook de lytische werking van de andere phagen op C4-bacteriën werd door Tween 80 geremd. Evenmin als GROMAN en BOBB vonden wij een phagocide activiteit van Tween 80. Werd een phaagfiltraat (B) tienvoudig verdund in H.I.B.-Tween 80, 24 uur bij 37° C geplaatst en vervolgens 10^5 maal verdund in H.I.B., dan bleek de phaagtiter van de laatste verdunning gelijk aan die van een 10^{-6} verdunning in H.I.B. Hoewel GLASSMAN (1948) gewag maakte van een groeiremmende werking van oppervlaktespanningverlagende stoffen op C. diphtheriae is ons hiervan, wat Tween 80 in een concentratie van 0.1% betreft, niets gebleken.

De passageproef in H.I.B.-Tween 80 werd beperkt tot de bekend lysogene, toxische stammen, met de bedoeling deze uit te breiden tot andere toxische stammen, indien een volledig gunstig resultaat werd verkregen.

Met deze proef werd dus getracht een verband tussen toxiciteit en lysogeniteit aan te tonen bij een aantal willekeurige lysogene, toxische stammen, naast de C4(β) stam.

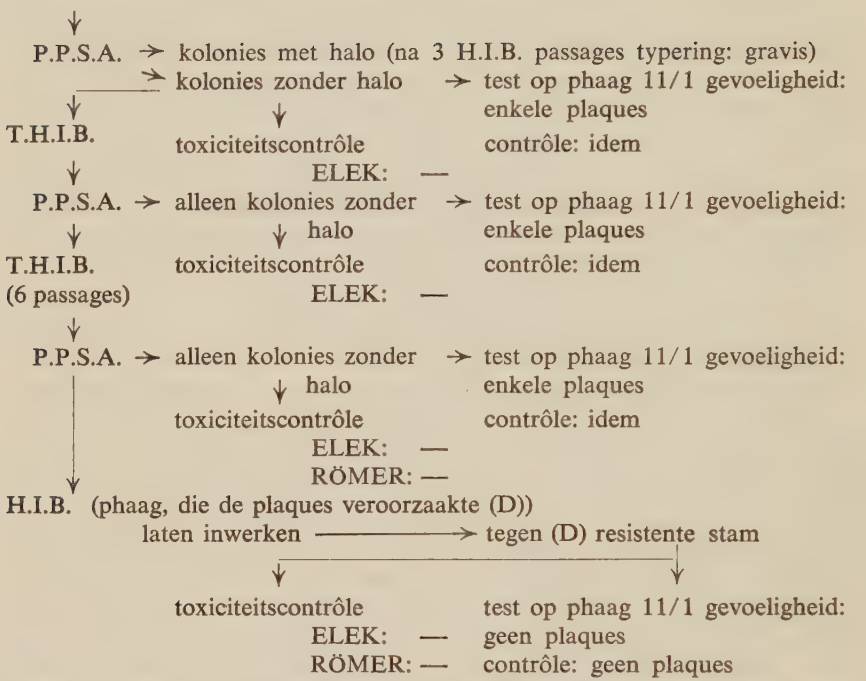
Alvorens tot passage van de betreffende stammen over te gaan werden deze door drie achtereenvolgende isolaties van één kolonie rein gekweekt om, voor zover dit hierdoor bij C. diphtheriae mogelijk is, te voorkomen, dat in de proef werd uitgegaan van een mengsel van toxische en atoxische c.q. lysogene en niet-lysogene bacteriën (in verband met het in klompjes groeien van diphtheriebacteriën is dit alleen geheel uit te sluiten, indien men uitgaat van één cel; om reeds genoemde redenen was dit echter niet mogelijk). Bij de bepaling van lysogeniteit, toxiciteit en type van de reingekweekte stammen werden geen verschillen in deze eigenschappen gevonden met die van de oorspronkelijke culturen.

Er werden 79 dagelijkse passages verricht van de stammen C4(β), 11, 13, 16, 22 en 39. De Tween-H.I.B. culturen van de 79e passage, die door de oppervlaktespanningverlagende werking van Tween 80 alle egaal troebel gegroeid waren (vgl. WARD, 1948), werden overgeënt op P.P.S.A. platen (zie Hoofdstuk III: G). Na 2 dagen bij 37° C en 5 dagen bij 4° C werden de op de platen gegroeide kolonies op de vorming van halo's onderzocht. Deze en de hierna volgende overentingen om nog in de cultuur aanwezige phagen te verwijderen, toxiciteits- en phaaggevoeligheidsbepalingen zijn hieronder schematisch weergegeven (T.H.I.B. = H.I.B. + 0.1% Tween 80).

C4(β)
T.H.I.B. 79
↓
P.P.S.A. — alleen kolonies zonder halo → test op phaag β gevoeligheid: zeer troebele plaques
↓
T.H.I.B. toxiciteitscontrôle bacteriecontrôle: idem
ELEK: —
↓
P.P.S.A. — alleen kolonies zonder halo → test op phaag β gevoeligheid: vele plaques
↓
T.H.I.B. toxiciteitscontrôle contrôle: enkele plaques
ELEK: —
↓
T.H.I.B.
↓
P.P.S.A. — alleen kolonies zonder halo → test op phaag β gevoeligheid: vele plaques
toxiciteitscontrôle contrôle: geen plaques
ELEK: —
RÖMER: —

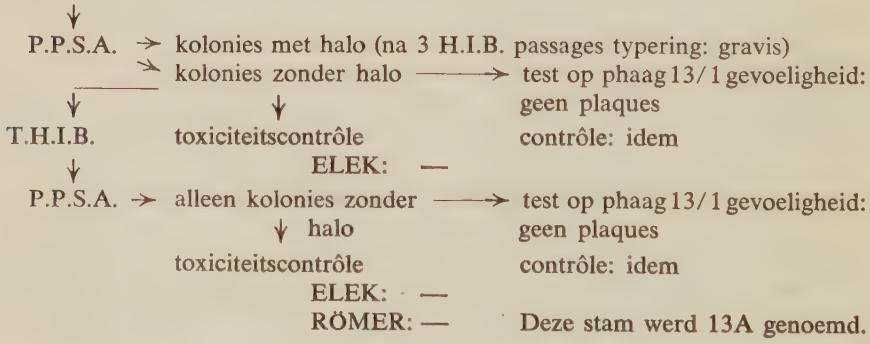
Deze stam was door phaag β tot toxiciteit te converteren, was gevoelig voor de overige phagen en in alle opzichten (type, phaaggevoeligheidspatroon) identiek met de stam C4.

11



Deze stam werd 11A genoemd. Phaag (D) was niet in staat stam C4 te lyseren. Adaptatie (6 passages) was niet mogelijk. Ook phaag 11/1 kon niet aan stam 11A worden geadapteerd (9 passages). De stam 11A had alle biochemische en culturele eigenschappen van een mitisstam. Ofschoon waarschijnlijk wel lysogeen door phaag (D), kon de lysogeniteit van stam 11A niet worden aangetoond.

13



Adaptatie van phaag 13/1 aan de stam 13A was niet mogelijk (4 passages); van deze stam kon geen lysogeniteit worden aangetoond. De stam 13A had alle biochemische en culturele eigenschappen van een mitisstam.

16, 22 en 39

T.H.I.B. 79

↓

P.P.S.A. → alle alleen kolonies met halo → gevoeligheidsbepalingen

van deze stammen voor de phagen, die uit de oorspronkelijke stammen geïsoleerd werden, waren alle negatief. De lysogeniteitsbepalingen van deze stammen vielen alle positief uit.

Het is dus inderdaad mogelijk om met deze methode de niet-lysogene, phaaggevoelige, atoxische stam C4 te verkrijgen uit de stam C4(β). Het feit, dat 79 T.H.I.B. passages van de stammen 16, 22 en 39 niet leidden tot de vorming van een cultuur van niet-lysogene bacteriën, kan zijn oorzaak hebben in een specificiteit van de adsorptieremmende werking van Tween 80 voor bepaalde bacterie-phaagsystemen van C. diphtheriae, doch kan ook verklaard worden door aan te nemen, dat het aantal passages niet voldoende was om niet-lysogene bacteriën te kunnen isoleren. Op de P.P.S.A. plaat bleken alle kolonies van deze stammen toxisch en identiek wat aspect betreft, zodat een eventueel aanwezige kolonie, bestaande uit niet-lysogene, toxische bacteriën, niet herkend kon worden. Daar de adsorptieremmende werking van TWEEN 80 waarschijnlijk bacterie- en niet phaagspecifiek is (vgl. GROMAN en BOBB, 1955) kan het feit, dat de betreffende phagen geen lysis konden geven van C4-bacteriën in T.H.I.B. geen steun vormen voor de tweede mogelijkheid. Welke verklaring de juiste is valt met de ons bekende gegevens dus niet te zeggen.

De stam 11 bleek na passage, en selectie van een atoxische kolonie, niet van een phaag te ontdoen. Deze phaag was niet identiek met de phaag 11/1, hetgeen blijkt uit de onmogelijkheid om deze phaag aan de C4-stam te adapteren.

Merkwaardig is de mutatie van de stammen 11 en 13 tot atoxische mitisstammen. De oorzaak van deze mutatie zou ook kunnen liggen in een directe werking van Tween 80 op de bacteriën, niet in verband staande met de remming van de phaagadsorptie. Doch ook indien dit het geval is geweest dan blijft het feit, dat deze stammen bij de mutatie zowel hun toxische als hun lysogene eigenschap verloren (de stam 11A is waarschijnlijk wel lysogeen door een andere phaag; mogelijk was de stam 11 dus dubbel lysogeen).

De resultaten van de T.H.I.B. passageproef met de stammen 11 en 13 zijn te verklaren door een direct verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bij deze stammen. De ongevoeligheid van de atoxische stammen 11A en 13A voor de phagen 11/1 en 13/1 laat een definitieve conclusie hieromtrent echter niet toe.

Toch menen wij, dat bovenstaande resultaten er op wijzen, dat ook bij toxische, lysogene diphtheriestammen, waarvan niet bekend is of een verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bestaat, een dergelijke correlatie aanwezig kan zijn. Zolang wij niets weten van een eventuele lysogeniteit van willekeurige toxische stammen, zullen wij hieruit echter geen conclusie mogen trekken ten gunste van de in de Inleiding gestelde hypothese. Of met de beschreven techniek een verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bij andere toxische diphtheriestammen aangetoond zal kunnen worden, zal afhankelijk zijn van de specificiteit van de phaagadsorptieremmende werking van Tween 80.

Hoofdstuk V

SLOTBESCHOUWING

De in Hoofdstuk IV: B beschreven experimenten leverden geen resultaten op, die wezen op een epidemiologische betekenis van het conversiephenomeen. Uit andere in genoemd Hoofdstuk beschreven proeven zijn echter gegevens naar voren gekomen, die, tezamen met door andere onderzoekers gedane waarnemingen, toch een verklaring kunnen geven voor de correlatie tussen het vóórkomen van atoxische diphtheriebacteriën en diphtherie.

Het feit, dat atoxische bacteriële mutanten in vitro kunnen worden geisoleerd uit toxische stammen (blz. 61 e.v.), zij het door een kunstbewerking (zie ook Crowell (1926) en Cowan (1927), blz. 13), doet de vraag rijzen of een dergelijk gebeuren ook in vivo kan plaatsvinden. Directe aanwijzingen hiervoor hebben wij niet, doch een aantal waarnemingen, van verschillende aard, pleit hiervoor.

Okell (1929) (blz. 13) vond een serologische identiteit van een atoxische stam van C. diphtheriae en een toxische. Een gemeenschappelijke bron van beide stammen was aannemelijk te maken. Chason (1936), Stebbins (1940) en Gill (1940) vonden een in vergelijking met het aantal dragers van virulente diphtheriebacteriën onverklaarbaar hoog aantal Schicknegatieve kinderen. Dit percentage was wel in overeenstemming te brengen met het aantal dragers van atoxische diphtheriebacteriën. De door Frobisher, Parsons en Updyke (1947) hiervoor gegeven verklaring, dat de weerstand van deze kinderen tegen diphtherie verhoogd zou zijn door een immuniserende werking van de atoxische bacteriën, is zeker niet uit te sluiten. Echter ook een mutatie van toxische bacteriën, die een subklinische infectie veroorzaakten, kan de gevonden uitkomsten verklaren. Ook het frequente vóórkomen van atoxische diphtheriebacteriën tijdens een epidemie (Barksdale en Pappenheimer, 1954) zou een mutatie van toxische in atoxische bacteriën als oorzaak kunnen hebben. Een dergelijke mutatie zou een reversie van lysogene, toxische en niet-lysogene, atoxische bacteriën en een selectie van de laatste kunnen betreffen.

Reversie in vitro is mogelijk gebleken (blz. 61 e.v.), al waren hiervoor kunstbewerkingen noodzakelijk. Wij menen met zekerheid te mogen aannemen, dat althans de isolatie van C4-bacteriën uit een cultuur van de stam C4(β) berustte op de selectie van bacteriën, die de lysogene eigenschap verloren hadden (vgl. blz. 59 en 61). Welke factoren echter, be-

halve phaagadsorptieremming, een rol kunnen spelen bij de selectie van niet-lysogene bacteriën, is niet te zeggen. De isolatie van niet-lysogene bacteriën uit een cultuur van een lysogene B. megatherium (Den Dooren de Jong, 1931; Flu, 1946; Lwoff, 1953; Clarke, 1952) (zie blz. 6 en 59) is namelijk niet alléén door een remming van de readsorptie van phagen aan bacteriën, die de lysogene eigenschap verloren, te verklaren. Waarschijnlijk was het aantal passages daarvoor, tenminste wat de drie eerstgenoemde auteurs betreft, te gering (vgl. Bertani, 1958; blz. 59).

Andere factoren dan de phaagadsorptieremming zijn dus vermoedelijk van invloed bij de selectie van niet-lysogene bacteriën uit oorspronkelijk lysogene bacterieculturen. Het lijkt ons waarschijnlijk, dat deze factoren gezocht moeten worden in milieu-invloeden. Ook in vivo zouden deze een rol kunnen spelen bij de selectie van niet-lysogene mutanten uit een lysogene cultuur. Misschien is de immuniteit als zodanig van betekenis. Aanwezigheid van antistoffen tegen de phagen zou ook een verklaring kunnen geven voor deze selectie, die dan toch het niet optreden van readsorptie van vrijgekomen phagen als oorzaak zou hebben. Het feit, dat twee atoxische, bij reconvalescenten geïsoleerde stammen tot toxische te converteren waren (Parsons en Frobisher, 1951), kan een argument vormen voor het optreden van reversie en selectie van niet-lysogene, atoxische bacteriën in vivo.

Er is geen reden om te veronderstellen, dat verlies van de lysogene eigenschap van een bacterie niet even goed in vivo als in vitro kan plaatsvinden. Een reversie van lysogene, toxische in niet-lysogene, atoxische bacteriën in vivo en een daarop volgende selectie van de laatste door milieu-invloeden kunnen zowel de bevindingen van Chason, Stebbins en Gill als het feit, dat tijdens een epidemie frequent atoxische diphtheriebacteriën voorkomen, verklaren.

Voor de hypothese van Hewitt (1952) (vgl. blz. 22), dat een drager van een onschuldig micro-organisme de bron en verspreider van de ziekte zou kunnen worden, indien een bacteriophaag aanwezig is, hebben wij geen argumenten kunnen vinden. Wel zou, volgens bovenstaande veronderstellingen, de bacteriophaag gezien kunnen worden als een agens, dat verantwoordelijk kan zijn voor de variaties in virulentie, die bij C. diphtheriae zijn waargenomen.

Wanneer wij de uitkomsten van de kruisneutralisatie- en kruisresistentieproeven stellen tegenover de experimenten, waarmee bij een aantal willekeurige toxische, lysogene stammen een verband tussen toxiciteit en lysogeniteit aannemelijk werd gemaakt, dan zal men hierin een zekere tegenstrijdigheid kunnen vinden. Immers uit de eerstgenoemde proevenserie blijken duidelijke verschillen tussen een phaag, waarvan het converterend vermogen aangetoond was en andere phagen, waarvan dit niet het geval was, terwijl uit de laatste proeven zou kunnen worden besloten, dat

de phagen 11/1 en 13/1 ook invloed hebben op het vermogen tot het produceren van toxine. De aangetoonde antigene en immunologische verschillen tussen phaag β en de overige phagen en tevens de verwantschap tussen vier van de andere vijf phagen zouden dus mischien niet afhankelijk zijn van het al dan niet aanwezig zijn van een converterend vermogen.

In dit verband willen wij nog eens enige experimenten van PARSONS (1955) en GROMAN (1956) aanhalen, namelijk die, waarbij het vermogen tot conversie werd aangetoond bij phagen, afkomstig van lysogene, atoxische stammen. GROMAN gaf drie mogelijke verklaringen voor dit verschijnsel (blz. 21).

Onze bevindingen met de phagen 11/1 en 13/1, die bij de voor deze phagen gevoelige stam C4 geen conversie konden veroorzaken, doch zeer waarschijnlijk bij de lysogene stammen 11 en 13 wel in verband stonden met het vermogen tot toxineproductie, kunnen o.i. het beste verklaard worden met de derde door GROMAN aangegeven mogelijkheid.

Neemt men de eerste verklaring als de juiste aan, dan zou de mutatie moeten plaatsvinden, samenvallend met de penetratie in een bacterie, die niet door deze phaag geconverteerd wordt. Het lijkt niet waarschijnlijk, dat dit het geval kan zijn zonder dat de eigenschappen van de bacterie hierbij een rol spelen. Zijn de bacteriële eigenschappen wel van invloed bij de mutatie, dan kan men ook het niet optreden van conversie zien als een onderdrukking van het converterend vermogen van een phaag door de bacterie, zoals de derde verklaring aangeeft.

De tweede mogelijkheid, recombinatie van twee niet converterende phagen tot een converterende, stelt het converterend vermogen van een phaag onafhankelijk van bacteriële eigenschappen anders dan de lysogeniteit. De stam C4 en andere door phaag β te converteren stammen zouden lysogeen moeten zijn door een phaag, die niet aantoonbaar was. Een essentieel verschil met de derde verklaring bestaat er dan niet meer. In beide gevallen is de conversie afhankelijk van de genetische eigenschappen van de bacterie, immers ook de prophaag moet gezien worden als een onderdeel van het genetisch patroon van de bacterie. Beschouwt men een phaag met converterend vermogen zelf als een recombinant dan stelt men dit vermogen geheel onafhankelijk van de eigenschappen van een voor die phaag gevoelige bacterie. Dit is in strijd met de feiten.

De derde mogelijkheid houdt in, dat de converterende werking van een phaag onderdrukt kan worden. Nader omschreven betekent dit, dat men dan een specificiteit aanneemt, niet alleen voor het infectiespectrum, doch ook voor het vermogen van een phaag om conversie te veroorzaken. Evenals de phaaggevoeligheid (voor lysis en lysogenisatie) zou ook een 'conversiegevoeligheid' van de bacterie voor een bepaalde phaag een rol spelen. Iedere gematigde diphtheriephaag zou een vermogen tot conversie kunnen bezitten, dat echter in vele gevallen latent blijft. Adaptatie, wat betreft het converterend vermogen alleen, is nooit aangetoond; wel bleken enige

phagen conversie te kunnen veroorzaken van stammen, waaraan de phagen eerst geadapteerd moesten worden (PARSONS, 1955; GROMAN, 1956).

Dat juist tussen phaag β en de overige phagen antigene en immunologische verschillen gevonden werden, behoeft geen verwondering te wekken, daar tussen de β-phaag en de andere phagen wel een verschil bestaat in het converterend vermogen ten opzichte van de stam C4. De gastheerspecificiteit van het converterend vermogen zou in bepaalde antigene of immunologische eigenschappen van de phaag tot uiting kunnen komen. De resultaten van onze kruisneutralisatie- en kruisresistentieproeven zijn daarmee in overeenstemming.

Uiteraard is het bovenstaande slechts een hypothese, waarvan het niet eenvoudig zal zijn om de juistheid te bewijzen. Wij hebben hiermee echter een mogelijke verklaring willen geven voor de bevindingen van PARSONS en GROMAN, en de resultaten van onze eigen onderzoekingen.

SAMENVATTING

Naar aanleiding van publicaties (o.a. FREEMAN, 1951; GROMAN, 1955, 1956; PARSONS, 1955), waarin een verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bij enige stammen van C. diphtheriae werd beschreven, werden onderzoekingen verricht met het doel een inzicht te verkrijgen in de correlatie tussen deze twee eigenschappen bij een aantal willekeurige toxische stammen van C. diphtheriae.

Een beschrijving van de toegepaste methoden gaat aan de bespreking van deze proeven vooraf.

Bij de experimenten waren 47 diphtheriestammen betrokken, waarvan de meeste in 1957 en 1958 in Nederland geïsoleerd waren; de atoxische mitisstam C4 en de corresponderende, door middel van een bacteriophaag toxisch gemaakte stam C4(β) werden toegezonden door Dr. N. B. GROMAN te Seattle, U.S.A.

Er konden geen atoxische diphtheriebacteriën worden aangetoond in de kelen van patiënten, noch in die van reconvalescenten, zodat een onderzoek naar het vermogen van een eventueel uit de toxische stam verkregen phaag om een gelijk geïsoleerde atoxische stam te converteren tot een toxische, niet uitgevoerd kon worden. De vraag naar het epidemiologisch belang van de in vitro aangetoonde mogelijkheid om een atoxische stam door middel van een phaag tot een toxische te converteren bleef daardoor onbeantwoord.

In totaal werden 6 phagen geïsoleerd uit de beschikbare toxische stammen. Uitgezonderd de stam C4 (β) behoorden de lysogene stammen tot het gravistype. Behalve phaag β bleek geen van de phagen in staat toxiciteit te veroorzaken bij de voor deze phagen gevoelige stam C4. Wel waren de tegen deze phagen resistent gemaakte stammen lysogeen.

De resultaten van kruisneutralisatieproeven met de zes geïsoleerde phagen en tegen vijf hiervan bereide antisera, en die van kruisresistentieproeven van phagen en lysogene stammen maakten een zekere indeling naar antigene eigenschappen en resistentiepatroon mogelijk. De niet tot conversie in staat zijnde phagen bleken min of meer verwant, phaag β werd alleen in geringe mate geneutraliseerd door een antiserum tegen een van de andere vijf phagen (39/1). Het resistentiepatroon van de lysogeen gemaakte stammen gaf een hiermee vergelijkbaar beeld, doch leidde tot een grovere indeling van de phagen.

In een tweede proevenserie werd uitgegaan van de hypothese, dat de toxiciteit van een diphtheriebacterie afhankelijk is van de lysogene eigen-

schap, die alleen niet aantoonbaar zou zijn wegens het ontbreken van een voor de betreffende phaag gevoelige stam.

Er konden geen verschillen vastgesteld worden in de U.V. gevoeligheid van de stammen C4 en C4(β), zodat er niet van U.V. bestraling gebruik gemaakt kon worden om de lysogeniteit van een diphtheriestam te bepalen, zoals bij E.coli mogelijk is gebleken.

Een voor B. megatherium beschreven methode om door middel van passage in een medium, dat citraat bevatte, niet lysogene uit lysogene stammen te verkrijgen, leverde bij 15 toxische stammen van C. diphtheriae, waarvan sommige bekend lysogeen waren, geen resultaat op.

Met behulp van een eigen techniek, berustend op de phaagadsorptieremmende werking van Tween 80, lukte het echter om uit de lysogene, toxische stam C4(β) de niet lysogene, atoxische stam C4 te isoleren. Ook uit twee van de overige vijf onderzochte lysogene, toxische stammen, waarvan geen enkel verband tussen toxiciteit en lysogeniteit bekend was, konden niet-lysogene, atoxische mutanten worden geïsoleerd. Deze mutanten waren echter ongevoelig voor de betreffende phagen. Toch geven deze uitkomsten een aanwijzing, dat ook bij deze stammen toxiciteit en lysogeniteit gecorreleerd zijn.

Tenslotte wordt een van de verklaringen, die GROMAN (1956) gaf voor het verschijnsel, dat uit lysogene atoxische stammen soms phagen kunnen worden geïsoleerd, die andere atoxische stammen tot toxiciteit kunnen converteren, uitgewerkt tot een hypothese, waarmee zowel de bevindingen van GROMAN (1956) en PARSONS (1955) als de resultaten van de beschreven onderzoekingen te verklaren zijn. Deze hypothese houdt in, dat er naast een infectiespectrum-specificiteit van de phaag ook een conversiespecificiteit zou bestaan, die tot uitdrukking kan komen in bepaalde antigene of immunologische eigenschappen.

SUMMARY

In consequence of reports (a.o. FREEMAN, 1951; GROMAN, 1955, 1956; PARSONS, 1955), in which a correlation was described between toxigenicity and lysogenicity in certain strains of C. diphtheriae, a number of experiments was carried out, attempting to gain some insight into the correlation between these features of any given toxic strain of C. diphtheriae.

A description of the methods used precedes the experiments.

For this study 47 strains of diphtheria bacteria, for the greater part isolated in the Netherlands during the years 1957 and 1958, were used. The non-toxic mitis strain C4 and the corresponding strain C4(β), being toxic on account of its lysogenicity, were kindly supplied by Dr. N. B. GROMAN, Seattle, U.S.A.

No non-toxic strains of C. diphtheriae could be isolated from throat-swabs of patients, suffering or convalescent from diphtheria. It was, therefore, not possible to examine the capacity of phages, which might have been isolated from toxic strains, to convert a simultaneously isolated non-toxic strain into a toxic one. Hence, the question, whether the converting property of certain phages is of epidemiological significance, could not be answered.

Six phages were isolated from the toxic strains available. The lysogenic strains, with the exception of strain C4(β), belonged to the gravis type. Excluding phage β, none of these phages appeared capable to induce toxigenicity in strain C4, which was susceptible to all phages. The strains, which have been made resistant to these phages, proved to be lysogenic.

The results of cross-neutralization tests performed with these phages and immune sera prepared against five of them, and those of cross-immunity tests, allowed classification of the phages according to antigenic properties and pattern of resistance. The five non-converting phages proved to be more or less related to one another, phage B was only slightly inactivated by an immune serum prepared against one of the other phages (39/1). The cross-immunity tests yielded comparable results, only permitting a more rough classification.

The second series of experiments was based on the hypothesis, that toxigenicity of any strain of C. diphtheriae depends upon the lysogenic property, which however, could not be verified for lack of a susceptible strain.

No differences could be found in the sensitivity to U.V. rays of the strains C4 and C4(β). Irradiation by U.V., therefore, could not be used

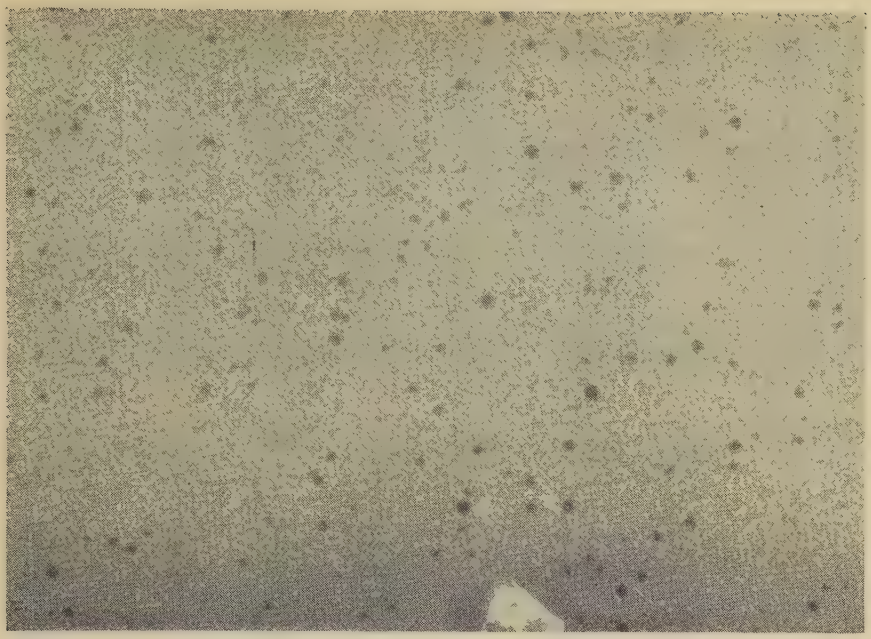
to determine lysogenicity of diphtheria strains, as has been proved to be possible with regard to strains of E.coli.

A method, described for B. megatherium, to obtain a non-lysogenic strain from a lysogenic one by passage in a medium, containing sodium citrate, remained without success when applied to 15 toxic strains of C. diphtheriae of which some were known to be lysogenic.

A new technique, based on the inhibition of phage-adsorption by Tween 80, was developed. With the aid of this technique the non-toxic, non-lysogenic strain C4 could be obtained from a culture of the toxic, lysogenic strain C4 (β).

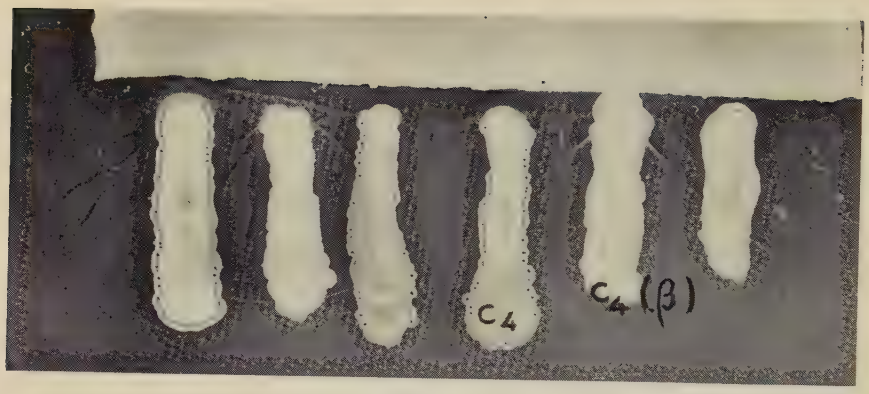
From two out of five lysogenic, toxic strains, of which no relation between toxigenicity and lysogenicity was known, non-lysogenic, non-toxic mutants could be isolated. These mutants were not susceptible to the phages, which were isolated from the original toxic strains. These results, however, provide circumstantial evidence of a relation between toxigenicity and lysogenicity in these strains.

A hypothesis, explaining the observations of GROMAN (1956) and PARSONS (1955) as well as the results of the experiments described in this report, is based on one of GROMAN's explanations for the phenomenon, that phages, which are capable of converting non-toxic strains into toxic ones, can occasionally be isolated from other, lysogenic, non-toxic strains. According to this hypothesis there exists, in addition to a host-range specificity, a conversion specificity of the phages, which can find expression in certain antigenic or immunologic properties.

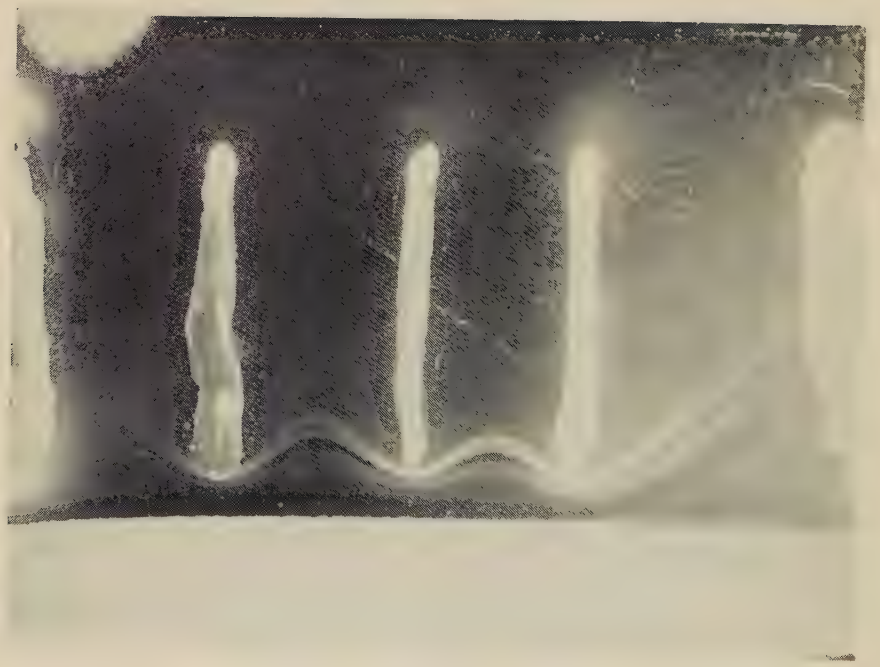


Plaat 1

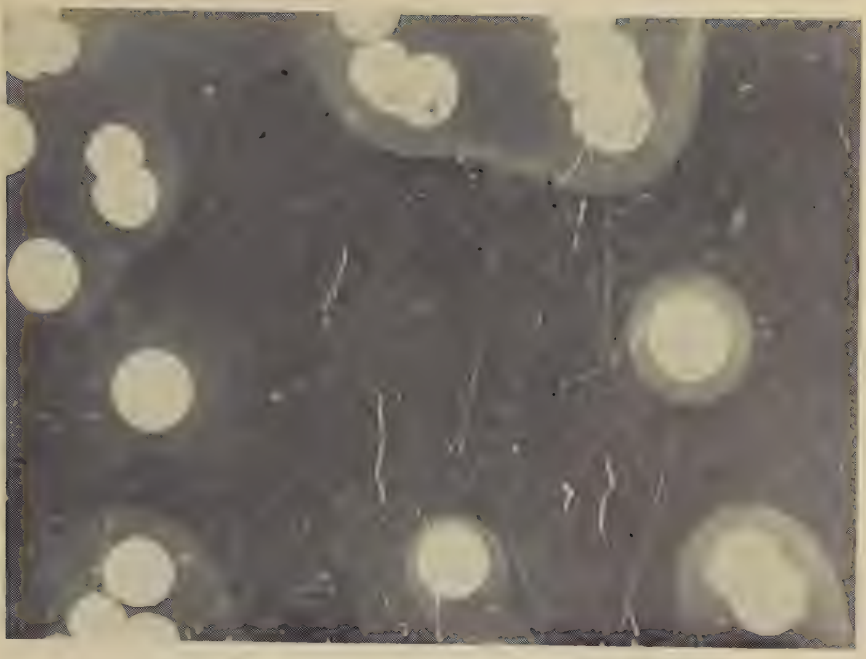
Plaat 2



Plaat 3



Plaat 4



Plaat 5

Plaat 6

LITERATUUR

Adams, M. H. (1950) Methods in medical research Vol. 2 blz. 1
Amies, C. R. (1954) J. Path. Bact. 67-25
Anderson, J. S., Happold, F. C., McLeod, J. W. en Thomson, J. G. (1931) J. Path. Bact. 34-667
Arber, W. en Kellenberger, G. (1958) Virology 5-458
Asheshov, I. N., Asheshov, I., Khan, S., Lahiri, M. N. en Chatterji, S. K. (1933) J. Ind. Med. Res. 20-1127
Bail, O. (1925) Med. Klin. 34-1271
Barksdale, W. L. en Pappenheimer, A. M. (1954) J. Bact. 67-220
Beeuwkes, H. en Brouwers, J. (1954) Tschr. Med. Anal. 9-1
Bertani, G. (1953) Ann. Instit. Past. 84-273
Bertani, G. (1953a) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 18-65
Bertani, G. (1954) J. Bact. 67-696
Bertani, G. (1958) Advances in Virusresearch blz. 151
Bertani, G. en Nice, S. J. (1954) J. Bact. 67-202
Blair, J. E. (1924) J. Inf. Dis. 35-401
Bordet, J. en Ciuca, M. (1920) C. R. Soc. Biol. 83-1293
Bordet, J. en Ciuca, M. (1920a) C. R. Soc. Biol. 83-1296
Bordet, J. en Ciuca, M. (1921) C. R. Soc. Biol. 84-747
Botez, A. (1921) C. R. Soc. Biol. 85-585
Bowen, H. E., Wyman, L. en McComb, J. A. (1954) Am. J. Hyg. 59-306
Boyd, J. S. K. (1956) Biol. Rev. 31-71
Boyd, J. S. K. (1956a) Nature 178-4525
Burnet, F. M. (1929) Brit. J. Exp. Path. 10-109
Burnet, F. M. en Lush, D. (1936) Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 14-27
Burnet, F. M. en McKie, M. (1929) Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 6-21
Chason, O. L. (1936) Am. J. Hyg. 23-539
Christensen, J. R. (1957) Virology 4-184
Christensen, P. E. (1957a) Act. Path. Microbiol. Scand. 41-67
Christison, M. H. (1933) J. Path. Bact. 37-243
Clarke, A. N. (1952) J. Bact. 63-187
Cohen, S. S. (1949) Bact. Rev. 13-1
Cowan, M. L. (1927) Brit. J. Exp. Path. 8-6
Cowles, P. B. (1931) J. Bact. 22-119
Craigie, J. en Brandon, K. F. (1936) J. Path. Bact. 43-233
Craigie, J. en Brandon, K. F. (1936a) J. Path. Bact. 43-249
Craigie, J. en Yen, C. H. (1938) Can. J. Publ. Health 29-448
Crowell, M. J. (1926) J. Bact. 11-65
Delbrück, M. (1940) J. Gen. Physiol. 23-631
Delbrück, M. (1940a) J. Gen. Physiol. 23-643
Delbrück, M. (1945) J. Bact. 50-131
Delbrück, M. (1945a) J. Bact. 50-137
Delbrück, M. (1946) Biol. Rev. 21-30
Doermann, A. H. (1948) Yearb. Carnegie Instit. Washington 47-176
Den Dooren de Jong, L. E. (1931) Zbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 120-1
Den Dooren de Jong, L. E. (1932) Kon. Acad. Wetensch. Proc.s. Sciences 35-116

Dudley, S. F. (1925) Brit. J. Exp. Path. 6-225
Dulbecco, R. (1952) Proc. Nat. Acad. Sci. 38-747
Eckart, W. (1956) Zschr. f. d. Ges. Inn. Med. 11-1057
Elek, S. D. (1948) Brit. Med. J. I-493
Fahey, J. E. (1952) Can. J. Publ. Health 43-167
Fejgin, Ba. (1925) C. R. Soc. Biol. 93-365
Ferris, A. A. (1950) J. Path. Bact. 62-165
Fisk, R. F. (1942) J. Inf. Dis. 71-161
Fleck, L., Duros-Kawecka, H. en Stankiewicz, C. (1957) Texas Rep. Biol. Med. 15-861
Fleck, L. en Kozak, W. (1958) Texas Rep. Biol. Med. 16-59
Fleck, L. en Kunicka, A. (1957) Texas Rep. Biol. Med. 15-850
Flu, P. C. (1946) Act. Leid. Schol. Med. Trop. XVII
Fowler, C. B. en Cohen, S. S. (1948) J. Exp. Med. 87-259
Freeman, V. J. (1951) J. Bact. 61-675
Freeman, V. J. en Minzel, G. H. (1950) Am. J. Hyg. 51-305
Freeman, V. J. en Morse, I. U. (1952) J. Bact. 63-407
Frobisher, M., King, E. O. en Parsons, E. I. (1951) Am. J. Clin. Path. 21-282
Frobisher, M. en Parsons, E. I. (1940) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45-165
Frobisher, M. en Parsons, E. I. (1943) Am. J. Hyg. 37-53
Frobisher, M., Parsons, E. I. en T'ung, T. (1942) J. Hyg. 35-381
Frobisher, M., Parsons, E. I. en Updyke, E. L. (1947) Am. J. Publ. Health 37-543
Frobisher, M. en Updyke, E. L. (1947) J. Bact. 54-609
Garbin, S. (1956) Fracastoro 49-33; Ref. Exc. Med. IV Med. Microbiol. Immun. Serol. (1957) 10-138
Gill, D. G. (1940) Am. J. Publ. Health 30-March Suppl.-25
Glassman, H. N. (1948) Bact. Rev. 12-105
Gratia, A. (1922) C. R. Soc. Biol. 86-276
Gratia, A. (1936) C. R. Soc. Biol. 123-506
Gratia, A. (1936a) Ann. Instit. Past. 57-652
Groman, N. B. (1953) Science 117-297
Groman, N. B. (1953a) J. Bact. 66-184
Groman, N. B. (1955) J. Bact. 69-9
Groman, N. B. (1956) Virology 2-843
Groman, N. B. en Bobb, D. (1955) Virology 1-313
Groman, N. B. en Eaton, M. (1955) J. Bact. 70-637
Groman, N. B. en Lockart, R. Z. (1953) J. Bact. 66-178
Gross, H. en Hussels, H. (1958) Zbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 171-313
Guelin, A. en Lépine, P. (1957) Ann. Instit. Past. 92-350
d'Hérelle, F. (1917) C. R. Acad. Sci. 165-373
d'Hérelle, F. (1918) C. R. Soc. Biol. 81-1160
d'Hérelle, F. (1922) cit. Blair, J. E. (1924) J. Inf. Dis. 35-401
d'Hérelle, F. (1924) Drie voordrachten over het verschijnsel der bacteriophagie. Vert. Dr. W. Storm van Leeuwen
d'Hérelle, F. (1926) Le Bactériophage et son comportement
Herriott, R. M. (1951) J. Bact. 61-752
Hershey, A. D. en Chase, M. (1952) J. Gen. Physiol. 36-39
Hershey, A. D., Kalmanson, G. en Bronfenbrenner, J. (1943) J. Immun. 46-267
Hewitt, L. F. (1947) Brit. J. Exp. Path. 28-338
Hewitt, L. F. (1948) Brit. J. Exp. Path. 29-181
Hewitt, L. F. (1952) J. Gen. Microbiol. 7-362
Hewitt, L. F. (1952a) Lancet 63-272
Hewitt, L. F. (1954) J. Gen. Microbiol. 11-261

Hewitt, L. F. (1954a) J. Gen. Microbiol. 11-272
Hewitt, L. F. (1954b) J. Gen. Microbiol. 11-288
Ionesco, H. (1953) C. R. Acad. Sci. 237-1794
Jacob, F., Fuerst, C. R. en Wollman, E. L. (1957) Ann. Instit. Past. 93-724
Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. en Wollman, E. L. (1953) Ann. Instit. Past. 84-222
Jacob, F. en Wollman, E. L. (1953) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 18-101
Jordan, J. H. en Kingsbury, A. N. (1922) Lancet II-1052
Kabeshima, T. (1919) C. R. Acad. Sci. 169-1061
Keogh, E. V., Simmons, R. T. en Anderson, G. (1938) J. Path. Bact. 46-565
King, E. O., Frobisher, M. en Parsons, E. I. (1949) Am. J. Publ. Health 39-1314
Klosterman, J. A. en Small, K. W. (1928) J. Exp. Med. 47-121
Kröger, E. (1957) Zbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 168-393
Krutova, A. S. (1956) Z. Mikrobiol. 4-31; Ref. Exc. Med. IV Med. Microbiol. Immun. Serol. (1957) 10-512
Lark, K. G. en Adams, M. H. (1953) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 18-171
Latarjet, R. en Miletic, B. (1953) Ann. Instit. Past. 84-205
Lautrop, H. (1950) Act. Path. Microbiol. Scand. 27-443
Lautrop, H. (1955) Act. Path. Microbiol. Scand. 36-274
Lisbonne, M. en Carrère, L. (1922) C. R. Soc. Biol. 86-569
Luria, S. E., Delbrück, M. en Anderson, T. F. (1943) J. Bact. 46-57
Luria, S. E. en Dulbecco, R. (1949) Genetics 34-93
Lwoff, A. (1951) Ann. Instit. Past. 81-370
Lwoff, A. (1953) Bact. Rev. 17-269
Lwoff, A. (1953a) Ann. Instit. Past. 84-225
Lwoff, A. (1957) Symp. Latency and Masking in Viral and Rickettsial Infections, -8
Lwoff, A. en Gutmann, A. (1950) Ann. Instit. Past. 78-711
Lwoff, A. en Jacob, F. (1952) C. R. Acad. Sci. 234-2308
Lwoff, A. en Siminovitch, L. (1952) Ann. Instit. Past. 82-676
Lwoff, A., Siminovitch, L. en Kjeldgaard, N. (1950) Ann. Instit. Past. 79-815
Mair, W. (1936) J. Path. Bact. 42-634
McLeod, J. W. (1950) J. Path. Bact. 62-137
Menton, J., Cooper, T. V., Duke, F. W. en Fussel, W. H. (1933) J. Hyg. 33-414
Minzel, G. H. en Freeman, V. J. (1950) Am. J. Hyg. 51-300
Morton, H. E. (1940) Bact. Rev. 4-177
Oeding, P. (1950) Act. Path. Microbiol. Scand. 27-16
Okell, C. C. (1929) J. Hyg. 29-309
Ouchterlony, O. (1949) Act. Path. Micriobiol. Scand. 26-507
Panyel, J., Huppert, J. en Barbu, E. (1957) Ann. Instit. Past. 93-183
Parsons, E. I. (1955) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90-91
Parsons, E. I. en Frobisher, M. (1940) J. Bact. 39-74
Parsons, E. I. en Frobisher, M. (1951) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78-746
Parsons, E. I. en Frobisher, M. (1953) Am. J. Publ. Health 43-269
Prittwitz, J. von (1943) Arch. f. Hyg. u. Bakt. 137-415
Robinson, D. T. (1934) J. Path. Bact. 39-551
Romanzi, C. A., Cavallero, F. en D'Adda, I. (1957) Zbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 170-389
Römer, P. H. (1909) Z. Immun. Forschung 3-208
Schönfeld, J. K. (1958) Pers. Mededeling
Shwartzman, G. (1928) J. Exp. Med. 47-151
Siemens, B. W. L. (1938) Dissert. Amsterdam
Smith, G. H. en Jordan, E. F. (1931) J. Bact. 21-75
Stebbins, E. L. (1940) Am. J. Publ. Health 30-March suppl. -36

Stolp, H. (1957) Arch. f. Mikrobiol. 26-55
Stone, F. M. en Hobby, G. L. (1934) J. Bact. 27-403
Stoppelman, M. R. H. (1948) Dissert. Amsterdam
Suslova, V. F. (1956) Z. Mikrobiol. 4-34; Ref. Exc. Med. IV Med. Microbiol. Immun. Serol. (1957) 10-512
Svet-Moldavskii, G. Y. (1956) Z. Mikrobiol. 4-59; Ref. Exc. Med. IV Med. Microbiol. Immun. Serol. (1957) 10-512
Swanstrom, M. en Adams, M. H. (1951) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78-372
Thibaut, J. en Frédericq, P. (1952) C. R. Soc. Biol. 146-1627
Thibaut, J. en Frédericq, P. (1956) C. R. Soc. Biol. 150-1039
Topley and Wilson (1956) Principles of Bacteriology and Immunity 4th Ed.
Toshach, S. (1950) Can. J. Publ. Health 41-332
Twort, F. W. (1915) Lancet II-1241
Wahl, R. (1953) Ann. Instit. Past. 84-51
Ward, M. H. (1948) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67-527
Watson, J. D. en Crick, F. H. C. (1953) Nature 171-737
Watson, J. D. en Crick, F. H. C. (1953a) Nature 171-964
Weigle, J. J. (1953) Proc. Nat. Acad. Sci. 39-628
Weigle, J. J. en Delbrück, M. (1951) J. Bact. 62-301
Welshimer, H. J. (1951) J. Bact. 61-153
Williams, R. E. O. en Rippon, J. E. (1952) J. Hyg. Cambr. 50-320
Wilson, G. S. en Atkinson, J. D. (1945) Lancet 248-647
Wollman, E. (1925) cit. Burnet, F. M. en Lush, D. (1936) Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 14-27
Zinder, N. D. en Lederberg, J. (1952) J. Bact. 64-679

ROBERT PETER MOUTON bezocht het Nederlands Lyceum te 's-Gravenhage van 1940 tot 1946. In dit jaar deed hij met goed gevolg eindexamen op de afdeling Gymnasium B, waarna zijn inschrijving als student bij de Faculteit der Geneeskunde van de Rijksuniversiteit te Leiden volgde.

In Februari 1955 behaalde hij aldaar het artsdiploma.

Van Mei 1955 tot Februari 1957 was hij als reserve officier-arts in dienst bij de Koninklijke Marine.

Sinds Februari 1957 is hij als assistent werkzaam op de afdeling voor Medische Microbiologie van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde en van de Rijksuniversiteit te Leiden.

DRUK: N.V. BATTELJEE & TERPSTRA — LEIDEN

STELLINGEN

I

De vaccinatie tegen pokken dient bij medisch en verplegend personeel verplicht gesteld te worden.

II

In de kliniek dient nauwkeurig overwogen te worden of men bij verwondingen, die tetanusprophylaxe noodzakelijk maken, antiserum zal toedienen dan wel een revaccinatie zal uitvoeren.

(Tasman, A., 1957, N. T. v. G. 101-1386)

III

Ter wille van de practische uitvoerbaarheid van de overgevoeligheidsreactie en de Besredka-techniek bij de tetanusprophylaxe door middel van antiserum, is het wenselijk dat tetanusantiserum ook in verdunningen in de handel komt.

IV

Gezien het grote aantal positieve uitkomsten van de reactie van Sabin-Feldman gedurende de laatste jaren, is het wenselijk dat een dergelijk onderzoek bij verschillende bevolkingsgroepen wordt uitgevoerd ten einde een inzicht te verkrijgen in de epidemiologie van toxoplasmose.

V

Indien pijnklachten verdwijnen of verminderen door toediening van een placebo, dan mag hieruit niet worden afgeleid, dat de oorzaak van deze klachten geheel of gedeeltelijk gelegen is in de psychische gesteldheid van de patiënt.

(Beecher, H. K., 1955, J. A. M. A. 159-1602)

VI

Indien een ziekte diagnostische moeilijkheden geeft, dient de klinikus niet alleen per exclusionem rekening te houden met een virusaetiologie van deze ziekte.

VII

De opvatting van Hall c.s., dat het uit de pancreas geïsoleerde enzym elastase een combinatie van twee elastolytische enzymen is, kan zelfs door hun eigen experimenten niet bevestigd worden.

(Hall, A., 1957, Arch. Biochem. and Biophys. 67-366)

VIII

Ter voorkoming van de verspreiding van diphtherie is het van belang, dat bij kinderen, bij wie virulente diphtheriebacteriën geïsoleerd zijn, een behandeling met terramycine beproefd wordt.

(Beliën, L., 1954, Tschr. Soc. Geneesk. 32-415)

IX

Het is waarschijnlijk, dat bij vele lysogene, toxische stammen van C. diphtheriae, waarvan geen verband tussen lysogeniteit en toxiciteit bekend is, een dergelijke correlatie toch aanwezig is.

X

Ten aanzien van beroepsmilitairen, die een tuberculeus longproces doorgemaakt hebben, dient, gezien de tegenwoordige therapeutische mogelijkheden en de daarmee samenhangende betere prognose, door de militair geneeskundige commissie een ruimer standpunt wat betreft geschiktverklaring ingenomen te worden dan voorheen het geval was.